UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTOINDUKTION DER POLARITÄT UND ZUM DIELEKTRISCHEN MEMBRANZUSAMMENBRUCH BEIM FUCUS-EI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BRUNO GAUGER

aus Saulgau

1978

78 184

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTOINDUKTION DER POLARITÄT UND ZUM DIELEKTRISCHEN MEMBRANZUSAMMENBRUCH BEIM FUCUS-EI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BRUNO GAUGER

aus Saulgau

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	6. April 1978
Dekan	Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. F.W. Bentrup
2. Berichterstatter	Prof. Dr. E. Bünning

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Inhaltsverzeichnis

-----	Verwendete Symbole und Abkürzungen	Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1.	Kultur und Präparation	6
2.2.	Photoinduktion der Polarität	9
2.3.	Anwendung kurzer elektrischer Pulse am Fucus-Ei	13
2.3.1.	Bestimmung der Keimrate nach Pulsexposition	13
2.3.2.	Messung des Membranpotentials unter Pulsexposition	14
2.3.3.	Beobachtung des $^{86}Rb^{+}$- und $^{36}Cl^{-}$-Effluxes unter Pulsexposition	16
3.	ERGEBNISSE	21
3.1.	Photoinduktion der Polarität	21
3.1.1.	Suche nach einem K^{+}-Effekt auf die Photoinduktion beim Fucus-Ei	21
3.1.2.	Einige Versuche an der Equisetum-Spore: Suche nach einer Zeitfunktion der "Reizverrechnung"	23
3.2.	Effekte kurzer elektrischer Pulse auf das Fucus-Ei	24
3.2.1.	Pulseffekt auf die Keimrate	24
3.2.2.	Pulseffekt auf das Membranpotential	25
A.	Ältere (>4 h) Zygoten unter Seewasser (KSW) mit 10 mM K^{+}	25
B.	Ältere (>4 h) Zygoten unter Seewasser (KSW) mit 1 mM und 100 mM K^{+}	28
C.	Junge (<3 h) Zygoten und unbefruchtete Eier	28
3.2.3.	Pulseffekt auf die Ionenabgabe	30
A.	Ionenefflux ohne Anwendung von Pulsen	30
B.	Ionenabgabe durch Pulse und ihre Bestimmung	32
C.	Wiederholbarkeit von Rb^{+}-Abgaben während desselben Effluxversuchs	33

Seite

D. Kritische Spannung anhand der Abgaberaten und des Pulsabgabe-Diagramms 34

E. Resümee für die Pulsdauerfunktion der krit. Spannung 35

F. Rb^+-Abgabe bei schrittweise erhöhter (überkritischer) Pulsspannung 36

G. Rb^+-Abgabe unter Seewasser mit 100 mM K^+ 36

H. Rb^+-Abgabe von Zygoten und unbefruchteten Eiern bei 1-facher und 10-facher Pulsung, Fehlerbemerkung 37

I. Rb^+-Abgabe gerade befruchteter Zygoten 38

J. Abhängigkeit der Rb^+-Abgabe von Pulszahl und -abstand 39

K. Versuch mit $^{36}Cl^-$ 40

4. DISKUSSION 41

4.1. Entwicklungsgeschichte des Fucus-Eies 41

4.2. Untersuchungen zur Photoinduktion der Polarität 43

4.2.1. Vorbemerkungen zur Polaritätsinduktion bei Fucus und Equisetum 43

4.2.2. Prüfung der K^+-Abhängigkeit der Photoinduktion: Orientierung der Photorezeptoren durch das elektrische Feld der Membran? 45

4.2.3. Zeitfunktion der Störung eines gerichteten durch einen ungerichteten Lichtreiz bei Equisetum 47

4.3. Untersuchungen zum Dielektrischen Membranzusammenbruch (DMZ) am Fucus-Ei 50

4.3.1. Tatsachen zum DMZ, Intentionen bei Fucus 50

4.3.2. Effekt eines DMZ auf das Membranpotential 56

4.3.3. Effekt eines DMZ auf die Ionenabgabe 58

A. Kritische Spannung - Vergleich mit Membranpotential-Effekt 58

Seite

B. Pulsdauerfunktion der kritischen Spannung, RC-Zeit der Membran von Zygoten und unbefruchteten Eiern 59

C. Kritisches Membranpotential bei Zygoten und unbefruchteten Eiern 60

D. Mögliche Effekte bei längerer Pulsdauer 61

E. Bestätigung des elektromechanischen Modells des DMZ? 62

F. Einfluß der Zellentwicklung auf die Membranstruktur? 63

G. Rb^+-Abgabe von Zygoten und Eiern, Turgorabhängigkeit indiziert Massenfluß 63

H. Rb^+-Abgabe gerade befruchteter Zygoten 65

I. Interpretation des Membranpotential-Effekts anhand der $Rb^+(K^+)$-Abgabe 65

J. Sekundäre Einflüsse des DMZ und kurzer Pulse 66

K. Pulsintervallfunktion der Rb^+-Abgabe 67

L. Pulszahlfunktion der Rb^+-Abgabe 68

M. Cl^--Abgabe 68

4.3.4. Einfluß eines DMZ an jungen Zygoten auf deren Keimrate 69

4.3.5. Fazit der Untersuchungen zum DMZ 69

5. ZUSAMMENFASSUNG 72

6. LITERATUR 74

7. ABBILDUNGEN 77

Verwendete Symbole und Abkürzungen

C_m	Kapazität der Membran (in $\mu F\ cm^{-2}$, bezogen auf die Flächeneinheit)
C_P	Kapazität des Pulskondensators (Pulskapazität)
DMZ	Dielektrischer Membranzusammenbruch
E_m	Elektrisches Feld über der Membran ("elektr. Membranfeld") ($E_m = \frac{dV_m}{dx}$, x: transversale Koordinate der Membran)
E_P	Pulsfeldstärke ($U_p \cdot l^{-1}$, l: Elektrodenabstand)
E_{krit}	krit. Pulsfeldstärke eines Pulseffekts
K_a^+	K^+-Konzentration des Mediums
K_i^+	K^+-Konzentration in der Zelle
KSW	Künstliches Seewasser
P_1	Unipolare Orientierung der Polarität einer Zellpopulation
P_2	Bipolare Orientierung der Polarität einer Zellpopulation
P_E	Von E_m ausgeübte kompressive Kraft auf die Membran
P_T	Vom Zellturgor ausgeübte kompressive Kraft auf die Membran
P_M	Mechanische (elastische) rücktreibende Kraft der Membran
R_m	elektr. Widerstand der Membran (in ohm cm^2, bezogen auf die Flächeneinheit)
R_P	Widerstand zwischen den Pulselektroden
U_P	Pulsspannung (Spannung zwischen den Pulselektroden am Beginn des Entladungspulses)
U_{krit}	kritische Pulsspannung eines Pulseffekts

V_K	Gleichgewichtspotential des K^+ ($V_K = -58 \log \frac{K_i^+}{K_a^+}$)
V_m	Elektr. Potentialdifferenz über der Membran (Membranpotential)
V_p	Maximales der Membran beim Puls aufgeprägtes Potential (an den Zellpolen, deren Oberflächen senkrecht zum Feld liegen)
V_e	Eigenpotential der Membran ohne Puls
V_{krit}	Kritisches Membranpotential des DMZ
$V_{p,krit}$	Krit. V_p des DMZ
Y	Elastizitätsmodul der Membran
ε	Dielektrizitätskonstante der Membran
ρ	Spezifischer Widerstand des Seewassers (KSW)
σ_M	Mittlerer Fehler (Standardabweichung) des Mittelwerts ($\sigma_M = \sqrt{N^{-1}} \cdot \sqrt{(\sum (X_i - M)^2)\ (N-1)^{-1}}$, M: Mittelwert der N Einzelwerte X_i)
τ_m	Ladungsdauer (RC-Zeit) der Membran ($\tau_m = R_m C_m$)
τ_p	Abklingdauer eines Pulses (Pulsdauer): Zeit bis zum Erreichen des 1/e-fachen Ausgangswerts von Pulsspannung und -strom ($\tau_p = R_p C_p$)
λ_{max}	Wellenlänge maximaler Intensität

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0047

1.
EINLEITUNG

Polaritätsinduktion an der Zygote von Fucus als Beispiel pflanzlicher Orientierungsvorgänge. Photorezeption am Plasmalemma? Die Ausbildung der Zellpolarität ist ein entscheidender morphogenetischer Vorgang. Die Frage seiner Kontrolle durch äußere und innere Faktoren stellt sich besonders klar bei freien einzelligen, zunächst nicht erkennbar polaren Entwicklungsstadien. Das Ei der marinen Braunalge Fucus und die Spore des Schachtelhalms (Equisetum) werden hierzu seit längerem untersucht (vgl. HAUPT, 1962, wo auch die älteren Arbeiten gewürdigt sind).

Es liegt nahe, daß die Zellperipherie der Ort der Aufnahme und zumindest teilweisen Verarbeitung der von außen bezogenen Information ist. Spielt etwa das Plasmalemma diese Rolle einer die Umwelteinflüsse regelnden Instanz?

Von den Photorezeptoren der Polaritätsinduktion (Induzierung der Rhizoidanlage in der Peripherie der zunächst sphärischen Zelle an der Fucus-Zygote (wie auch der Equisetum-Spore) ist bekannt, daß sie mit ihren Schwingungsebenen parallel (periklin) zur Zelloberfläche in der Zellperipherie angeordnet sind (dichroitisches Verhalten) (JAFFE, 1958; JAFFE und ETZOLD, 1962). Es bleibt aber, wie auch bei allen anderen pflanzlichen (s. dagegen BLASIE, 1972a, b und OESTERHELT u. STOECKENIUS, 1973) Lichtorientierungen, offen, ob sie im Plasmalemma liegen. Dies konnte bisher auch durch verfeinerte biochemische Verfahren nicht bestätigt werden (MARME, 1977). Das Plasmalemma wird aber auch von uns als Ort der Photorezeptoren vermutet. Es erscheint zur geordneten Unterbringung der Rezeptormoleküle geeignet, weil wir von ihm ohnehin die Fähigkeit der Konservierung des Struktur- und Funktions-Zustands in ihm befindlicher Elemente erwarten (Transporteigenschaften). Es erhebt sich allerdings die Frage nach den Kräften, die

diesen Strukturzustand aufrechterhalten. Zwischen benachbarten Membranelementen wirkende Kräfte dürften wegen des als fluide anzunehmenden Grundzustands der Membran nicht ausreichen.

Eine mutmaßliche Aufgabe bei der Kontrolle des Strukturzustands der Membran messen wir dem elektrischen Feld E_m über der Membran zu, entweder als indirekt durch Kompression des Plasmalemmas auf die Membranelemente wirkende Kraft (Elektrostriktion) oder direkt an deren Ladungen angreifend.

In der Hypothese von BENTRUP (1974) wird die elektrische Potentialdifferenz über der Membran (Membranpotential V_m) genutzt, um die Photorezeptoren im elektr. Membranfeld E_m wie Dipole auszurichten.

Zur Prüfung dieser Hypothese soll das Membranpotential über die K^+-Konzentration des Mediums (Verschiebung des K^+-Gleichgewichtspotentials V_K) variiert werden. Ihre Bestätigung wäre der erste Nachweis der Lokalisation von Photorezeptoren im pflanzlichen Plasmalemma.

Eine Reihe orientierender Versuche wurde - ohne direkt auf die Lokalisation der Photorezeptoren zu zielen - zur Frage der zeitlichen "Verrechnung" der suszipierten Information an der Spore von Equisetum variegatum ausgeführt und ebenfalls in diese Arbeit aufgenommen.

Der Dielektrische Membranzusammenbruch (DMZ). Das Phänomen und seine diagnostische Anwendbarkeit. Neben der Polaritätsinduktion befassen wir uns - im zweiten Teil unserer Untersuchungen - mit dem sog. Dielektrischen Membranzusammenbruch als Effekt kurzzeitiger Erhöhung des elektrischen Membranfelds E_m.

Die Kontrolle durch das elektrische Feld sollte sich zumindest in der Störung der Membranstrukturen und -funktio-

nen zeigen, wenn E_m im Experiment kurzzeitig bis zum Erreichen eines kritischen Punktes gesteigert wird.

Ein solcher Effekt, hergestellt durch kurze elektrische Strompulse über die Membran, ist seit neuerem als Dielektrischer Membranzusammenbruch (DMZ) bekannt. Er ist durch die Beseitigung des elektromechanischen Kräftegleichgewichts zwischen zusammenpressenden Kräften (Kraft des elektrischen Felds P_E und des Turgors P_T) und der elastischen rücktreibenden Kraft P_M zu interpretieren. Für das Gleichgewicht gilt: $P_E + P_T + P_M = 0$. Der DMZ wurde zuerst durch ZIMMERMANN et al. (1973) beschrieben (ZIMMERMANN et al., 1976). Ein hiervon zu unterscheidender Effekt einer E_m-Erhöhung ist der sog. punch through (Durchschlagen der Membran in Form eines drastisch erhöhten Ionendurchmarschs), bei dem die Ladungsdauer $\tau_m = R_m C_m$ der Membran erheblich überschritten werden muß, um eine Veränderung des Ionenprofils zu erreichen (COSTER, 1965 und 1969).

Der DMZ sagt allerdings nichts über die natürliche Rolle von E_m für die Membranstruktur, allenfalls darüber, inwieweit sich die Membran und ihre Elemente auf direkte oder indirekte (elektrostriktive) Weise überhaupt dem elektrischen Feld unterwerfen und von ihm belasten lassen.

Es geht uns überhaupt um die Anwendung des DMZ als - reversible (!) - Membranstörung zur Diagnose von Zell- und Membraneigenschaften unseres entwicklungsbiologischen Objekts. Außerdem sollen das Ei und die Zygote von Fucus zur weiteren Aufklärung des Phänomens des DMZ und seiner Folgeprozesse beitragen.

Die Reversibilität des DMZ bezieht sich in erster Linie auf das offenkundige Ausheilen ("resealing") der Membran. Unser Objekt gestattet anhand der den Entwicklungserfolg anzeigenden Vorwölbung der Rhizoidanlage (Auskeimung) auch die Prüfung der langfristigen Unschädlichkeit für die Zelle.

Die Fucus-Zygote macht nach der Befruchtung bis zur Auskeimung drastische, vor allem die Membran betreffende Änderungen durch: Auflagerung der Zellwand und Ausbildung eines Zellturgors vor allem durch Akkumulation von K^+- und Cl^--Ionen (Änderung von Transporteigenschaften der Membran); Änderung des Membranpotentials von ca. -20 mV auf -80 mV (in etwa das K^+-Gleichgewichtspotential V_K). (BENTRUP, 1970; WEISENSEEL u. JAFFE, 1972; ALLEN et al., 1972).

Wir fragen nach der Höhe des kritischen Membranpotentials, bei dem das Kräftegleichgewicht sich nicht mehr einstellen kann, und versuchen, dieses elektromechanische Modell zu überprüfen: Haben die entwicklungsabhängig (Turgor, Membranpotential) und experimentell (V_m über die K^+-Konzentration des Mediums) variablen Kräfte auf die Membran den geforderten Einfluß auf das aufzuprägende krit. Membranpotential? Ob dieser Einfluß bemerkbar ist, hängt von der Genauigkeit unserer Bestimmung und von der Höhe des gesamten (aufgeprägten plus der Membran eigenen) krit. Membranpotentials ab.

Ändert sich durch den Funktionswandel der Membran, wozu neben der Änderung von Transporteigenschaften z.B. auch die Erlangung einer mutmaßlich im Plasmalemma lokalisierten Photosensibilität gehört (s.o.), die im krit. Membranpotential sich ausdrückende "elektromechanische Belastbarkeit" der Membran?

Inwieweit lassen sich durch einen DMZ grundlegende Membraneigenschaften stören? Wird zum Beispiel die Barrierenfunktion am Ort des DMZ aufgehoben? In der Tat wurden durch einen DMZ ausgelöste Stoffbewegungen über die Zellgrenze beobachtet (ZIMMERMANN et al., 1976). Es liegt nahe, daß der DMZ vorübergehend ein Leck hinterläßt und ein Massenfluß ("bulk flow") über die Membran stattfindet. Der Vergleich von turgorfreien unbefruchteten Eiern mit turgeszenten älteren Zygoten läßt einen solchen Massenfluß anhand der zu erwartenden Turgorabhängigkeit möglicherweise bestätigen.

Als Indikatoren des DMZ bieten sich das Membranpotential mit seinem bei älteren Zygoten recht hohen Betrag und der Efflux von $^{86}Rb^{+}(K^{+})$ an, für den angesichts der hohen K^{+}-Konzentration der Zelle eine genügende Aufladung zu erwarten ist.

Fucus-Ei oder -Zygote erlauben im übrigen als nicht-vakuolisierte Zellen, den DMZ von einem Tonoplasten unbehindert zu studieren und etwa das eindeutig aufs Plasmalemma bezogene krit. Membranpotential anzugeben.

2.
MATERIAL UND METHODEN

2.1.
Kultur und Präparation

a. Fucus-Ei

Kulturmedium. Es wurde "künstliches Seewasser" (KSW) verwendet, welches in seinen Hauptkomponenten mit natürlichem Seewasser identisch ist und sich wie folgt zusammensetzt (vgl. BENTRUP, 1968) (mM): NaCl: 459 - $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 28 - $MgCl_2 \cdot 2\ H_2O$: 25 - $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$: 10 - KCl: 9,7 - $NaHCO_3$: 20.

Durch Zusatz von 10 mM TRIS/HCl wurde das Medium gepuffert (pH 7,9).

Sollte die K^+-Konzentration von der des natürlichen Seewassers mit 10 mM abweichen, so wurde unter Konstanthaltung der Osmolarität die Konzentration des KCl auf Kosten von NaCl variiert.

Die Ionenleitfähigkeit $\varkappa$ des KSW beträgt 0,0395 $ohm^{-1}cm^{-1}$, der spez. Widerstand ρ also 25,32 ohm cm (BENTRUP, 1968).

Gewinnung der Thalli. Die ♀ und ♂ Thalli von Fucus serratus wurden im Felswatt vor Helgoland gesammelt und in einer Thermosflasche nach Tübingen geschickt. Gekühlt aufbewahrt, konnten die ♂ Thalli bis etwa 1 Woche lang intakte Gameten liefern, die ♀ Thalli auch länger.

Waschen und Befruchtung. Zur Gewinnung der Eier (Ø ca. 70 µ) wurden die ♀ Thalli mit Seewasser suspendiert und mehrfach gewaschen. Öfters kam es vor, daß die Eier erst nach der Suspendierung aus den Oogonien freigesetzt wurden. Es ist anzunehmen, daß sich der Zustand der Eier nach der Frei-

setzung allmählich verschlechtert, doch wurden auch nach mehr als einem Tag mit gutem Prozentsatz auskeimende Zygoten erzielt.

Zur Befruchtung wird die von ♂ Thalli durch einmaliges Spülen gewonnene Suspension, welche neben Spermatozoiden auch Unrat enthält, mit der Eiersuspension vereinigt.

Nach 10 min sind mutmaßlich mehr als 90 % aller Befruchtungen erfolgt. Von diesem Zeitpunkt an wird das Alter der Zygoten gerechnet.

Nach 20 min - die Beweglichkeit der Spermatozoiden hat dann erheblich nachgelassen - beginnt das Auswaschen der Suspension, welches bis zu 1 1/2 h in Anspruch nimmt. Hierzu wird KSW benützt, vorher teilweise auch natürliches Seewasser (aus Westerland).

Herstellung von Präparaten. Nach etwa 4 h können sich die Zygoten durch Schleimbildung festheften.

Zur Herstellung von Präparaten läßt man die Eier vorher auf der gewünschten Unterlage sich absetzen. Man erhält auf diese Weise Populationen, deren Individuen ihre räumliche Orientierung auf der Unterlage im Verlauf der Entwicklung beibehalten und z.B. auch Medienwechsel erlauben.

Zu den Polaritätsversuchen wurden Uhu-plus -geklebte Küvetten aus Diaglas der Dicke 1 mm mit den inneren Abmessungen 33 mm x 33 mm x 9 mm verwendet, z.T. auch Küvetten aus 4 mm dickem Plexiglas mit den inneren Abmessungen 29 mm x 29 mm x 6 mm.

Licht, Temperatur. Die Kultur nach der Befruchtung und die meisten Versuche erfolgten bei 15° C. Manche Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (sämtliche Membranpotentialversuche und einige Effluxversuche (s. Abbildungslegenden)).

Die Präparate der Versuche zur Polaritätsinduktion wurden im Dunkeln gehalten. Die bei den Versuchen nötigen Manipulationen ermöglichte nicht induktionswirksames rotes "Sicherheitslicht" (15 - 40 W / 220 V -Birne hinter rotem Plexiglas).

b. Equisetum-Spore

Kulturmedium. Die Equisetum-Sporen wurden in 1 %igem Agar (Fa. Merck) kultiviert, der mit Kulturmedium (sog. 1/10 EQ-Lösung) angesetzt war, welches durch 10-fache Verdünnung aus wie folgt zusammengesetztem Medium (sog. EQ-Medium) hervorging (mM): KCl: 0,1 - NaCl: 10,0 - $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$: 0,1 - $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$: 5,9 - $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$: 13,9 (pH 6,55).

Gewinnung der Sporen. Die Sporen (Equisetum variegatum) wurden im Botanischen Garten Tübingen gesammelt und gekühlt aufbewahrt.

Aussaatpräparation. Bei Berührung mit Feuchtigkeit beginnen die Sporen ihre Entwicklung. Dies geschieht durch Aussaat der Sporen (ø ca. 65 µ) auf gerade erstarrendem Agar, welcher in ca. 1 mm hoher Schicht auf einen Objektträger (35 mm x 35 mm) gegeben wurde, und anschließendem Überschichten mit weiterem, eben noch flüssigem (48° C) Agar. Vor der Aussaat wurden durch Klopfen der Sporenmasse mit einer Pinzette die Hapteren abgetrennt. Durch die Einbettung in Agar sind die Sporen ähnlich wie die Fucus-Zygoten auf dem Präparat fixiert. Die Präparate müssen durch flüssigen oder feuchten Kontakt am Austrocknen gehindert werden.

Licht, Temperatur. Die Kultur erfolgte bei 25° C. Spätestens 20 min nach Aussaat werden die Sporen ins rote "Sicherheitslicht" (s.o.) verbracht, da die photosensible Phase der Polaritätsinduktion früh beginnt. Dieses deckt auch

einen gewissen Lichtbedarf, der bei der Fucus-Zygote fehlt. Nach 24 h überführen wir in Weißlicht, dessen Blauanteil zum Austreiben des Rhizoids benötigt wird.

2.2.
Photoinduktion der Polarität

a. Messung der Polaritätsinduktion

Die zunächst spärische Zelle (Zygote oder Spore) bildet an einer Stelle ihrer Peripherie die Rhizoidanlage. Diese markiert die Achse der Zellpolarität. Als ihre Richtung definieren wir die auf den Rhizoidpol hinführende, also die der späteren Auskeimung.

Als Parameter der induzierenden Wirkung eines gerichteten Faktors auf eine Zellpopulation dient der von HAUPT (1957) eingeführte Induktionsvektor, dessen Richtung die der Gesamtreaktion auf den Reiz (diesem gleich- oder entgegengerichtet) und dessen Betrag der Orientierungswert P ist.

Den Orientierungswert erhält man auf folgende Weise: Das Präparat wird unterm Mikroskop durchgegangen und für jedes Individuum entschieden, in welchen der acht 45°-Sektoren seine Keimungsrichtung fällt. Die Häufigkeiten der Individuen in den Sektoren werden nach Multiplikation mit geeigneten Gewichtungsfaktoren addiert. Im Falle einer unipolaren Reaktion - z.B. auf einseitige Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht (Abb. 5, E) nehmen wir als Faktor den cos des Winkels α zwischen Sektor und Reaktionsrichtung. Der Orientierungswert wird also:

$$P_1 = \frac{\sum N_\alpha \cos\alpha}{N_{ges}} \cdot 100\ \%$$

(α = Winkel zwischen Sektor und Reaktionsrichtung
= 0°, 45°, ... , 315° (jew. $\pm$ $22{,}5^{\circ}$)

N_α = Anzahl der im Sektor α gekeimten Individuen
N_{ges} = Gesamtzahl der Individuen).

Im Falle einer bipolaren Reaktion - etwa auf senkrecht zum Präparat einfallendes linearpolarisiertes Licht (Abb. 5, P) ist dieser Faktor der cos des doppelten Winkels α zwischen Sektor und Reaktionsachse bzw. einer der beiden Reaktionsrichtungen:

$$P_2 = \frac{\sum N_\alpha \cdot \cos 2\alpha}{N_{ges}} \cdot 100\ \%$$

Auf diese Weise ist für eine intermediäre Gewichtung der Keimungsrichtungen zwischen den Extremfällen der Richtung der Gesamtreaktion (Faktor +1) und der entgegengesetzten Richtung (Faktor -1) gesorgt.

b. Versuchsanordnungen

Lichtquelle. Als Lichtquelle dienten Quarz-Jodid-Lampen in Diaprojektoren oder - für höheren Energiebedarf - Xenonlampen. An Filtern wurden verwendet:

KG-Filter (KG 1 der Fa. SCHOTT) zur Absorption der Wärmestrahlung.

Plexiglasfilter (Nr. 627 der Fa. RÖHM & HAAS) mit dem Wellenlängenmaximum bei 456 nm.

Interferenzlinienfilter (IL) 459 nm (Fa. SCHOTT) - nur in Verbindung mit einer Xenonlampe verwendet.

Polarisationsfilter (POLAREX) zur Herstellung linear polarisierten Lichts.

Neutralgläser zur gröberen Intensitätseinstellung. Die genauere Intensitätseinstellung geschah mittels eines Stromreglers an der Lampe. Die Energie wurde über ein Multiflex-Galvanometer und eine Thermosäule

bzw. eine mit dieser geeichten Photozelle gemessen.

Im folgenden sind die für Fucus serratus - in 1 Fall für Equisetum variegatum - verwendeten Versuchsanordnungen beschrieben.

Versuche bei kurzer (1 s - 16 min) Belichtung mit unpolarisiertem Licht. Abgesehen von 1 der 4 in Abb. 9 vereinigten Versuche, bei dem mit blauem Plexiglas gefiltertes Licht eines Diaprojektors (Fa. LIESEGANG) aus 158 cm Entfernung und einer Neigung von 6^{o} einfiel, wurde IL-gefiltertes Xenonlicht verwendet, das über einen Spiegel mit einer Neigung von 4^{o} auf das ca. 20 cm vom Spiegel entfernte Präparat geworfen wurde.

Versuche bei kurzer (1 s - 16 min) Belichtung mit linear polarisiertem Licht. Hierbei diente ein innen geschwärztes Holzkästchen von 5 cm x 5 cm Grundfläche zur horizontalen Unterbringung des Präparats und der Filter (KG-, IL-, Polarisationsfilter). Das Licht (Xenonlampe) fiel vertikal in die Anordnung ein.

Versuche mit 1 h -Belichtung (Fortsetzung der Dosiseffektkurve bei 1 s - 16 min -Belichtung). Hierfür wurde Xenonlampe und Plexiglasfilter verwendet, da ein langer Lichtweg nötig war, um eine Anzahl Präparate gleichzeitig vom Lichtkegel bedecken zu können. (Bei kürzerer Belichtung können die Präparate in der photo-sensiblen Phase hintereinander exponiert werden.) Im Falle unpolarisierten Lichts fiel selbiges mit dem Neigungswinkel 4^{o} ein. Die Küvetten waren, wie sogleich beschrieben, in 3 Etagen angeordnet.

Versuche bei langer (6 h) Belichtung mit unpolarisiertem Licht. Um eine möglichst große Anzahl Präparate belichten zu können, wurden je 3 Küvetten in besonderen, aus 5 cm x 5 cm -Diagläsern zusammengebauten Haltern übereinanderge-

stapelt. Die Küvetten waren durch geschwärzte Zwischengläser getrennt. An der Frontscheibe des Küvettenhalters konnte ein Neutralglas angebracht werden. Das Licht (LIESEGANG-Projektor, Plexiglas-Blaufilter) fiel aus 158 cm Entfernung mit einer Neigung von 6^{o} auf die Präparate. Es lassen sich 5 Küvettenhalter nebeneinander im Lichtkegel aufstellen.

Versuche bei langer (6 h) Belichtung mit linear polarisiertem Licht. Am Objektiv des vertikal gerichteten LIESEGANG-Projektors waren - 112 cm über dem Boden - Plexiglas- und Polarisationsfilter angebracht. Die ausgeleuchtete Bodenfläche reichte für eine größere Anzahl Präparate aus. Die Neutralgläser wurden über die einzelnen Präparate gelegt.

Versuche an Equisetum: Gabe eines einseitigen Reizes und eines ungerichteten Reizes mit unpolarisiertem Licht. Zu diesen orientierenden Versuchen wurde nicht das Fucus-Ei, sondern die Spore von Equisetum variegatum verwendet. Der einseitige Reiz wurde mit einem Diaprojektor (LIESEGANG) (Plexiglas-Blaufilter) auf das 54 cm entfernte Präparat gegeben. Der - in der horizontalen Ebene des Präparats - ungerichtete Lichtreiz kam aus einem horizontal gerichteten Projektor (LEITZ) (Plexiglas-Blaufilter), dessen Lichtkegel gleich nach Verlassen des Objektivs von einem Spiegel senkrecht aufs Präparat gelenkt wurde. Die Mitte des Spiegels befand sich 16,5 cm über dem Präparat, dem zur Schwächung des vertikalen Reizgradienten ein weiterer Spiegel unterlegt war.

2.3.
Anwendung kurzer elektrischer Pulse am Fucus-Ei

2.3.1.
Bestimmung der Keimrate nach Pulsexposition

Die Pulse wurden in Form eines durch Entladung einer Kapazität hergestellten elektrischen Stroms gegeben, in dessen als homogen angesehenem Feld sich die Zellen befanden.

Den Vorversuch an der Keimrate konnte ich freundlicherweise bei Herrn Prof. ZIMMERMANN (Institut für biophysikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich) an der von ihm entwickelten Entladungskammer (ZIMMERMANN et al., 1974b) ausführen.

Bei dieser befinden sich die Zellen als Suspension zwischen plattenförmigen Pt-Elektroden. Der Strom streicht also nicht wie bei den späteren Pulsexpositionen während der Messung des Membranpotentials und der Eluierung von $^{86}Rb^+$ und $^{36}Cl^-$ entlang der Zellunterlage über die Zellen hinweg (s.u.).

Den Widerstand R_p über den entladen wird, liefert die Schicht des zwischen den Platten befindlichen Suspensionsmediums (KSW): $R_p = \rho\, l\, q^{-1}$ (spez. Widerstand des KSW: $\rho = 25{,}32$ ohm cm; Elektrodenabstand: $l = 1$ cm; Elektrodenquerschnitt: $q = 3$ cm x 3 cm). Die Zeit (Pulsdauer), nach der die anfängliche Pulsspannung auf den e-ten Teil abgeklungen ist, beträgt bei der gewählten Kapazität $C_p = 12{,}85\ \mu F$ 36 μs.

Die Zellsuspensionen (junge, <3 h alte Zygoten) wurden nach der Pulsexposition in den auch für Polaritätspräparate verwendeten Küvetten ausgesät und später die Keimrate (prozentualer Anteil der gekeimten Zellen) unter dem Mikroskop bestimmt.

2.3.2.
Messung des Membranpotentials unter Pulsexposition

Temperatur. Die Zellen wurden bei 21 - 24° C in die Versuchsküvette eingebracht.

Potentialmessung in der Entladungskammer. Die Pulsexposition geschah in einer für unsere gleichzeitige Messung des Membranpotentials entwickelten Entladungskammer (Abb. 1), die mir ebenfalls von Herrn Prof. ZIMMERMANN freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Zu den Potentialmessungen wurden Glaskapillaren (Spitzen-Ø ca. 2 µ) verwendet. 0,5 M KCl diente, wie auch bei der Referenzkapillare, als Brücke zur Ag^+/AgCl-Elektrode.

Zum Anstechen werden die Zellen (Z) senkrecht von oben durch das Mikroskop beobachtet und mit der schräg geführten Mikroelektrode (ME) gegen die gerade Seite eines Deckglasstücks ("Barrikade") von 100 µ Dicke gedrückt. Die Barrikade (B) ist auf einen Objektträger aufgeklebt (BENTRUP, 1970).

Unbefruchtete Eier oder junge Zygoten können auf den Objektträger aufsuspendiert werden, ältere, festhaftungsfähige Zygoten wurden vorher auf diesem Träger ausgesät. Mit der Mikroelektrode lassen sich diese Zellen dann bugsieren.

Pulsexposition. Zur Pulsexposition ist die Barrikade zwischen den plattenförmigen Pulselektroden (Pt-überzogenes Messing) (in Abb. 1 a gestrichelt angedeutet) plaziert. Das Feld, das durch einen Strompuls entlang der stromparallel gerichteten Barrikade (100 µ Höhe) am Ort der Zelle (Ø 70 µ) entsteht, können wir als weitgehend homogen ansehen, solange vermieden wird, daß andere Zellen unmittelbar benachbart liegen. Die Feldstärke ist dann gleich der Spannung zwischen den Platten dividiert durch den Plattenabstand 1. Da dieser 1 cm beträgt, gibt die Spannung in V

auch die Feldstärke in V cm^{-1} an.

Pulsdauer. Der Widerstand R, über den die Pulskapazität C entladen wird, ist mit guter Näherung durch das rechteckige Flüssigkeitsstück (KSW) zwischen den Platten gegeben (Querschnitt q = 0,6 cm x 1,2 cm): $R_p = \rho\, 1\, q^{-1}$ = 35,17 ohm. Nach der Zeit $\tau_p = R_p\, C_p$, welche wir als Pulsdauer bezeichnen, ist die Spannung zwischen den Elektroden, deren Anfangswert U_p wir Pulsspannung nennen, auf $e^{-1} \cdot U_p$ abgefallen.

Meß- und Pulsschaltung. Für einen Großteil der Versuche (diejenigen an >4 h alten Zygoten in 10 mM K^+) wurde der Meßkreis mit einem Verstärker (KEITHLEY 610 C) und den Registriergeräten (Schreiber, Oszillograph) an dessen Ausgängen geschaltet. Hierbei blieb der Entladungskreis (Kondensator, Voltmeter) ohne Erdung. In anderen Versuchen wurde Meß- und Referenzelektrodenpotential jeweils auf einen geerdeten Verstärker gegeben und die Differenz erdfrei gemessen. Dann konnte auch das Bad - über eine der Pulselektroden - geerdet werden, was einen erheblich geringeren "Brumm" auf dem Oszillographen bedeutete. (Abb. 1 c.)

Die Spitze der Referenzkapillare lag während des Pulses außerhalb des Plattenbereichs in der Mittelebene zwischen beiden Platten.

Es wurde kontrolliert, daß nach Pulsen keine Versetzung des ohne Zelleinstich angezeigten Potentials auftrat (Blindeffekt). Ein Ausschlag des Registriergeräts beim Puls ist in jedem Fall zu beobachten.

2.3.3.
Beobachtung des $^{86}Rb^{+}$- und $^{36}Cl^{-}$-Effluxes unter Pulsexposition

Verwendete Radionukleotide. Die radioaktiven Substanzen wurden in folgender Form bezogen (Fa. AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig): 1 ml $^{86}Rb^{+}$-Standard, enthaltend 5 mCi und 0,4 mg Rb^{+} in wässriger Lösung von RbCl, und 1,1 ml $^{36}Cl^{-}$-Standard, enthaltend 0,1 mCi und 8,18 mg Cl in wässriger Lösung von NaCl (die Halbwertszeit von $^{86}Rb^{+}$ beträgt 19,5 Tage, von ^{36}Cl $2 \cdot 10^{6}$ Jahre).

Pulsexposition in der Effluxküvette. (Abb. 2) Es soll die durch einen Puls bewirkte Ionenabgabe auf dem Hintergrund des normalen Efflux beobachtet werden. Die radioaktiv geladenen Zellen werden in einer Durchlaufküvette kontinuierlich mit KSW ausgewaschen (eluiert). Wie bei der Pulsküvette zur Membranpotentialmessung streicht der Pulsstrom entlang der Zellunterlage über die Zellen hinweg.

Mögliche Zellzahl pro Versuch. Zwischen den Elektroden (E), deren Abstand 1 wieder 1 cm beträgt, ergibt sich bei ihrer Länge von 4 cm eine Fläche von 4 cm^{2} zur Unterbringung der Zellen (Z). Hierauf können bei durchschnittlichem Abstand von 3 Zell-Ø (70 µ) ca. 5000 Zellen Platz finden. Die Zahl der Zellen - meist lag sie unter 1000 - ist in den Abb. zu den Versuchen vermerkt.

Zellunterlage (Objektträger oder Gaze). Im Falle älterer, festhaftungsfähiger Zygoten saßen diese auf der Unterseite des das Strömungsvolumen nach oben begrenzenden Objektträgers (O), der auf 3 mm hohen, aus Glaskapillaren gefertigten Böcken (A) ruhte. Nicht festhaftende Zellen lagen auf dem Boden eines zwischen den Elektroden untergebrachten rechteckig-wannenförmig gestalteten Stücks aus Nylongaze von 15 µ Maschenweite (G), dessen Ränder einzelne mitge-

schwemmte Zellen in der Küvette zurückhalten sollten (Abb. 2 b). Beim Auswaschen ließ sich beobachten, daß das Gros der Zellen auf der Unterlage liegenblieb. Ein dem Gazestück unterlegter Objektträger (O) rückte die Zellunterlage genügend weit in den Raum zwischen den Elektroden hinein.

Pulsdauer. Der Flüssigkeitsquerschnitt q zwischen den Elektroden (Gitter aus Pt-Ir-Draht) beträgt 4 cm x 0,3 cm, der Widerstand also $R_p = \rho 1\, q^{-1} = 21{,}1$ ohm. Mit der Pulskapazität C_p wird die Pulsdauer wieder $\tau_p = R_p C_p$.

Pulsschaltung. Zur Entladung wurde die unterbrochene Verbindung des Kondensators mit einer der Pulselektroden betätigt. Zum Aufladen wurde der Kondensator mit einem Doppelschalter an die Spannungsquelle geschlossen.

Bewerkstelligung des Durchlaufs. Um den gewünschten Durchlauf zu bekommen, lag der Auslauf durch leichte Neigung der Küvette etwas vertieft (Abb. 2 a). Ein- und Austrittsmündung waren zur Strömungslenkung konisch geformt (Abb. 2 c). Die Laminarität der Strömung wurde mit Neutralrot getestet.

Zulauf und Auslauf geschahen mittels Glaskapillaren (GK) und einer Einlaufrinne (ER). Vor dem Eintropfen ins Szintillationsgläschen (SG) war noch ein Trichter (T) mit Gazesieb (GS) von 15 µ Maschenweite zu passieren.

Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde mit einer Schraubklemme am Zuleitungsschlauch auf 50 - 70 Tropfen pro min aus der Auslaufkapillare eingestellt. Dies ergab in der im allgemeinen verwendeten Fraktionsdauer von 5 min ca. 10 ml.

Auswaschverhalten der Effluxküvette. Abb. 3 zeigt die nach Immission zweier Aktivitätsmengen (2100 und 11700 cpm) aus der Küvette aufgefangenen cpm (5 min-Fraktionen). Nach ca. 20 bzw. 30 min erst hat sich der cpm-Wert wieder dem Background (26 cpm) angenähert. Offenbar bilden sich in der

Küvette Strömungsbahnen und mangelhaft von der Strömung erfaßte Bereiche heraus. (Bei idealer Durchmischung würde der Anteil des auszuwaschenden Mediums am gesamten in der Küvette befindlichen Medium mit der Zeit t und dem Exponenten $-(v\ V^{-1}) \cdot t$ abnehmen (Durchlaufgeschwindigkeit v = 2 ml min^{-1}. Küvettenvolumen V = 1,2 cm^3). Das ergäbe eine Halbwertszeit von 0,41 min.)

Kontrolleluierung ohne Zellen. Beim Einbringen der Zellen kann mit den Resten des Inkubationsbads an der Zellunterlage eine erhebliche Menge von Aktivität in die Küvette eingeschleppt werden. Diese wird noch langsamer ausgewaschen als die geringeren Aktivitätsmengen von eben. Der Kontrollversuch mit einem Gazestück ohne Zellen ist in Abb. 4 dargestellt. Nach einer Stunde lag der cpm-Wert der Fraktionen (einschließlich des Backgrounds von 26 cpm) noch über 100 (die gesamte eingeschleppte Aktivität (Summe der Aktivitäten der Fraktionen) betrug 120 000 cpm).

Wir haben darauf verzichtet, unsere Ergebnisse zur Abgabe aus den Zellen von diesem Beitrag der Reste des Inkubationsbads zu reinigen. Es ergeben sich aber für uns keine qualitativ und quantitativ wesentlichen Verfälschungen, soweit diese nicht in der Diskussion einzelner Versuche mit niedrigen cpm-Abgabewerten von uns angesprochen werden.

Pulsungen während der Eluierung, Kontrollpulsungen ohne Zellen. Die von mehreren während des Auffangens einer Fraktion gegebenen Pulsen (die eine "Pulsung" ausmachen) bewirkten cpm-Abgaben aus den Zellen sind nicht zu unterscheiden. Die Ionenabgabe einer weiteren Pulsung während einer späteren Fraktion ist erst nach genügendem Auswaschen der vorhergehenden Pulsungsabgabe zu bestimmen.

Zu Kontrollzwecken ohne Zellen mit Gaze bzw. Objektträger vorgenommene Pulsungen auch großer Pulszahl erbrachten keine Ionenfreisetzung.

Herstellung der Temperatur in der Küvette. Um in der Küvette die Temperatur von 15° C zu bekommen, wurde der Zuleitungsschlauch in Windungen durch ein Wasserbad (KG) geführt. Einige Experimente wurden bei 21 - 23° C vorgenommen (s. Abbildungslegenden der Effluxversuche).

Inkubation der Zellen. Die Temperatur während der radioaktiven Inkubation der Zellen wurde durch ein Wasserbad auf 15° C gehalten.

Im Falle der $^{86}Rb^+$-Inkubation sollten K^+ und das diesem ähnelnde (Transportverhalten) Rb^+ zusammen die für K^+ üblichen 10 mM im KSW ergeben. Zur Herstellung genügend hoher radioaktiver Spezifität (Zahl der Zerfälle in der min (dpm) pro Mol K^+ - Rb^+) ist allerdings aufgrund der hohen Spezifität des Rb^+ im Standard nur ein geringer Anteil des Rb^+ an diesen 10 mM erforderlich.

Inkubiert wurden im Rahmen eines Versuchs nur eine oder wenige Populationen auf den für die Effluxküvette bestimmten Objektträgern oder Gazestücken. Auf diese wurden die Zellen nach der Befruchtung oder dem Waschen aufsuspendiert.

Inkubationsdauer. Die Zygoten wurden im nicht festhaftungsfähigen Alter (< 3 h) ins Inkubationsbad gebracht und im Alter von 5 - 10 h zum Auswaschen entnommen. Die unbefruchteten Zellen wurden z.T. einige Stunden, z.T. 1 Tag inkubiert.

Vorwaschen. Der Objektträger bzw. die Gaze passierte nach der Inkubation einige Waschbäder mit "kaltem" KSW, meist zwei Bäder von ca. 10 ml.

Zellzahlbestimmung. Die Zellzahl pro Präparat konnte am Ende des Auswaschens unter dem Mikroskop bestimmt werden. Bei der Gaze-Unterlage bietet sich das Auszählen eines Aliquots

der vor der Inkubation hergestellten Zellsuspension an. Voraussetzung ist, daß praktisch alle Zellen dieser Suspension inkubiert werden und bis zum Ende des Auswaschens nicht verlorengehen. Hierfür sorgte die Wannenform des Gazestücks, die während der Inkubation und dem Vorwaschen durch einen Glasrahmen aufrechterhalten wurde.

Messung der aufgefangenen Aktivität. Zu dem im 20 ml-Szintillationsgläschen aufgefangenen Eluat wurde die ihm etwa gleiche Menge Szintillator (Unisolve 1 der Fa. ZINSSER, Frankfurt) gegeben. Nach Durchmischung ergab sich ein Gel.

Die Messung wurde im ß-Strahlenzählgerät (Fa. PACKARD, Modell 3385) vorgenommen. Die Meßdauer pro Probe war 1 min. Bei längeren Meßdauern wäre bei $^{86}Rb^{+}$ der Zerfall zu berücksichtigen.

Eine Quenchkorrektur erwies sich bei $^{86}Rb^{+}$ - anders als bei ^{36}Cl - anhand von Proben bekannten Aktivitätsinhalts bei geeigneter Verstärkungseinstellung als überflüssig. Die von uns bevorzugte Messung ohne Verstärkung lieferte bei $^{86}Rb^{+}$ 62,2 % des wahren Inhalts, bei ^{36}Cl 44,7 %. Durch diese Prozentwerte sind also unsere gezählten Zerfälle pro min (cpm) zu dividieren, um auf die wahre Aktivitätsmenge (Zahl der stattfindenden Zerfälle pro min, dpm) zu kommen.

Messung der Restaktivität nach der Eluierung. Die Zellen wurden nach dem Auswaschen samt Unterlage (Objektträger, Gaze) mit je 10 ml Szintillator und KSW in ein Szintillationsgläschen gegeben und wie die Auswaschfraktionen gemessen.

3.
ERGEBNISSE

3.1.
Photoinduktion der Polarität

3.1.1.
Suche nach einem K^+-Effekt auf die Photoinduktion beim Fucus-Ei

Im ersten Teil unserer Arbeit untersuchen wir die Photoinduktion der Richtung der Zellpolarität im einzelligen Entwicklungsstadium. Die Polarität ist mit der Anlage des Rhizoids in der Peripherie der zunächst sphärischen Zelle festgelegt und die Erfassung der Zellen einer exponierten Population liefert den Induktionserfolg (Orientierungswert, s. S. 9).

In der Hypothese von BENTRUP (1974) kommt die dem Absorptionsgradienten von linear polarisiertem Licht zugrundeliegende perikline (oberflächenparallele) Anordnung der Schwingungsebenen der Photorezeptoren (JAFFE, 1958, JAFFE und ETZOLD, 1962) durch den Einfluß des elektrischen Felds E_m über der Membran, dem mutmaßlichen Ort der Photorezeptoren, zustande (s. S. 45). Dieser möglichen Feld-Abhängigkeit der Reaktion auf polarisiertes Licht sollte unter Veränderung des stark K^+-abhängigen Membranpotentials V_m älterer Fucus-Zygoten über die K^+-Konzentration K_a^+ des künstlichen Seewassers (KSW) nachgegangen werden.

Die von uns angewandte Erhöhung von K_a^+ von 10 auf 30 bzw. 100 mM verändert V_m von ca. -80 mV auf -55 bzw. -30 mV (BENTRUP, 1970).

Unsere Versuche ergaben aber keinen signifikanten K^+-Effekt auf die Dosiseffektkurve der Polaritätsinduktion, weder für linear polarisiertes, parallel zur Zellunterlage schwingendes Licht (Induktion des Rhizoidpols an einer der beiden

senkrecht zur Schwingungsebene liegenden Stellen der Zellperipherie, wo am wenigsten Licht absorbiert wird, Abb. 5, P) noch im Falle von einseitig auf die Zellen treffendes Licht (Induktion des Rhizoidpols an der lichtabgewandten Zellseite, Abb. 5, E).

Untersucht wurden die Dosiseffektkurven der Belichtung mit der Intensität 1200 mW • m^{-2} (bei der Wellenlänge 459 nm im Gipfel des Aktionsspektrums; BENTRUP, 1963) in der Mitte der photosensiblen Phase (9 - 15 h nach Befruchtung), wobei ein Zwischenminimum auftritt (s.S. 44), und der mehrstündigen Belichtung vom Alter 9 - 15 h über fast die gesamte photosensible Phase hinweg.

Die jeweils in einer Reihe von Versuchen behandelten Fälle sind im folgenden dargestellt. Zu aus mehr als zwei Werten gebildeten Mittelwerten ist deren Standardabweichung angegeben.

1) Kurze (1 s - 1 h) Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht und auf die Belichtung beschränkte K^+-Exposition von 30 und 100 mM (Abb. 6 und 7). In diesen Versuchen wurde das Medium wenige Minuten vor Belichtung ausgetauscht, damit sichergestellt war, daß bei ihrem Beginn die K^+-Konzentration an der Zelle eingestellt war.

2) Lange (6 h) Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht und gleichzeitiger 30 mM K^+-Exposition (Abb. 8).

3) Kurze (1 s - 1 h) Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht und 30 mM K^+-Exposition während Belichtung (Abb. 9). Die K^+-Exposition war in einem Teil der Versuche nicht auf die Belichtung beschränkt, lag aber immer im Alter von 9 - 15 h.

   Der Wert für 1 h Belichtungszeit stammt aus einem Versuch. Er liegt im zweiten Anstieg der Dosiseffektkurve, welcher bei einstündiger Bestrahlung mit polarisiertem Licht nicht erreicht wurde. (Die Dosiseffektkurve ergab

sich im übrigen - ohne daß dies zu fordern wäre - als im ähnlichen Dosisbereich liegend.)

4) Lange (6 h) Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht und gleichzeitiger 30 mM K^+-Exposition (Abb. 10).

3.1.2.

Einige Versuche an der Equisetum-Spore: Suche nach einer Zeitfunktion der "Reizverrechnung"

Unabhängig von der Frage der Lokalisation der Photorezeptoren wurde in diesen orientierenden Versuchen die Frage nach einer "Gedächtnisfunktion" in der Kausalkette von der Suszeption zur Reaktion aufgegriffen.

Einem Absorptionsgradienten, hergestellt durch einseitiges Licht, soll eine ungerichtete Reizintensitätsverteilung (Störreiz) überlagert werden, welche durch senkrecht aufs Präparat fallendes Licht hergestellt wird. Die Ungerichtetheit gilt streng nur für die horizontale Beobachtungsebene, jedoch ist zur Dämpfung des vertikalen Reizgradienten dem Präparat ein Spiegel unterlegt.

Die in einem Versuch unternommene Dosiseffektkurve dieser "Störinduktion" zeigte den Übergang in die Sättigung (Unterdrückung des invariant gehaltenen gerichteten Reizes) bei einer Intensität von 800 mW $\cdot$ m^{-2}, also gerade der des gerichteten Reizes (Abb. 11). Die Intensität des gerichteten Reizes war vorher anhand von Dosiseffektkurven als unterhalb des 1. Gipfels liegend gefunden worden. Die Belichtungen fanden 3 h nach Aussaat der Sporen statt.

Im Bereich des Übergangs in die Sättigung - gerichteter und ungerichteter Reiz beide 800 mW $\cdot$ m^{-2} - wurde nun die Zeitfunktion (Abhängigkeit der Reaktion von der Zeitstruktur der Suszeption) in einer Reihe von Versuchen getestet, die

aber wegen des niedrigen Ausgangswerts der Orientierung durch den gerichteten Reiz erst in ihrer Vereinigung Signifikanz erbringen. Der ungerichtete Reiz wurde im zeitversetzten Fall immer zuerst gegeben.

Als Effekt der Variation des Zeitabstands zwischen den Reizen ergaben unsere Versuche die Aufhebung der Unterdrückung des gerichteten Reizes bei zeitversetzter Gabe (am signifikantesten bei einem Intervall von 4 min) (Abb. 12).

3.2.
Effekte kurzer elektrischer Pulse auf das Fucus-Ei

3.2.1.
Pulseffekt auf die Keimrate

Der 2. Teil unserer Arbeit stellt Untersuchungen am Phänomen des Dielektrischen Membranzusammenbruchs (DMZ) (ZIMMERMANN et al., 1976) an, als dessen Indikatoren wir das Membranpotential und den Efflux von Ionen testen wollen.

Der DMZ soll in Übernahme eines der Verfahren von ZIMMERMANN durch extern applizierte, exponentiell abklingende elektrische Strompulse (Abklingdauer τ_p) erzeugt werden. Das in ihrem homogenen Feld E_p den Polen der feldparallelen Zellachse aufgeprägte Membranpotential beträgt 1,5 r E_p (s.S. 53). Für den Zellradius r können wir 35 μ einsetzen, für E_p die Spannung U_p zwischen den Pulselektroden dividiert durch den Elektrodenabstand 1cm. Diese Beziehung gilt aber für Pulse, deren Dauer lang ist gegen die Ladungsdauer τ_m der Membran, wohingegen wir bestrebt sind, diese RC-Zeit nicht bedeutend zu überschreiten, um ein Durchschlagen (punch through) der Membran (COSTER, 1965 und 1969) zu vermeiden.

Der DMZ besitzt Reversibilität, was die Regeneration (re-

sealing) der Membran angeht (COSTER und ZIMMERMANN, 1974). In einem Vorversuch wollen wir an unserem entwicklungsbiologischen Objekt prüfen, ob die gesamte Zelle in ihrer normalen Entwicklung bis zur Keimung beeinträchtigt wird.

Das Ergebnis zeigt den Einfluß eines auf junge (< 3 h) Zygoten gegebenen Pulses (τ_p = 36 µs) auf die Keimrate in Abhängigkeit von der Pulsspannung U_p. Die Keimrate wird erst oberhalb 6000 V beeinträchtigt. Gleichlaufend dazu bietet ein zunehmender Anteil der Zellen ein inhomogenes Bild, das die irreversible Schädigung anzeigt.

Wir wissen aber zunächst nicht, welche Pulsspannung für einen DMZ ausreicht und kommen daher nach der Erörterung der anderen Effekte kurzer Pulse darauf zurück (s. Diskussion, S. 69).

3.2.2.
Pulseffekt auf das Membranpotential

A. Ältere (> 4 h) Zygoten unter Seewasser (KSW) mit 10 mM K^+

Beschreibung des Effekts. Elektrische Messungen mittels Mikroelektroden wurden von BENTRUP (1970) und WEISENSEEL u. JAFFE (1972) ausführlich beschrieben, deren Daten bezüglich des Membranpotentials wir auch hier - bestätigt durch unsere eigenen Messungen - heranziehen.

Zunächst soll die Wirkung des DMZ auf das Membranpotential geprüft werden. Tatsächlich tritt ein Effekt kurzer Pulse (τ_p = 70 µs) auf: Bei genügend hoher Spannung U_p ist V_m (ca. 80 mV, WEISSENSEEL u. JAFFE, 1972; BENTRUP, 1970) nach dem Puls positiv versetzt. Sein Betrag steigt anschließend wieder an.

Bezüglich des Wiederansteigens scheinen 2 Fälle typisch:

Im häufigeren Fall ein Anfangsverlauf in Form einer Geraden, der sich später abflacht (Abb. 14), oder - meist bei größeren Potentialversetzungen - ein in konvexer Kurve beginnender Wiederanstieg (Abb. 15).

Möglicherweise gibt nur der 1. Fall den von uns intendierten Effekt eines DMZ wieder, während sich diesem im 2. Fall die Auswirkung eines Lecks überlagert, welches an der Eindringstelle der Mikroelektrode durch den DMZ oder die von ihm ausgelösten zellinneren Turbulenzen (im Zusammenhang mit dem Übertritt von Stoffen über die Zellgrenze) entsteht und alsbald abgedichtet wird.

Eine Ungewißheit besteht über das Membranpotential bis zum Abklingen des Pulsausschlags auf dem Registriergerät. Ein schneller Pulseffekt in dieser Zeit kann nicht ausgeschlossen werden. Mit dem Oszillographen ließ sie sich auf 0,1 s reduzieren.

Die Potentialversetzung tritt bei schrittweiser Erhöhung der Pulsspannung innerhalb einer Pulsserie meist plötzlich auf und ändert ihre Höhe bei weiterer Steigerung von U_p häufig dann nicht mehr.

Die kritische Pulsspannung liegt bei 70 µs-Pulsen meist im Bereich zwischen 150 und 250 V. Innerhalb einer Pulsserie an einer Einzelzelle läßt sich U_p im Rahmen von $\pm$ 50 V meist gut reproduzieren.

Störung des Effekts infolge Leckanfälligkeit. Der Effekt ist allerdings nur statistisch faßbar, da die Potentialversetzung nicht eindeutig von einem Leck-Artefakt zu trennen ist. Die Anfälligkeit für ein Leck an der Einstichstelle besteht wohl unabhängig vom Puls, wird aber z.T. wohl auch durch den Puls infolge Erschütterung oder (s.o.) vom DMZ ausgelöste innere Zellturbulenzen bewirkt. Eine Erschütterung beim Stromstoß ist allerdings unter dem Mikroskop mit bloßem Auge nicht zu erkennen.

Vereinigung von Einzelmessungen. Zur Vereinigung von Einzelmessungen werden die durch Pulse erzielten Potentialversetzungen ΔV_m aus einer Reihe von Zellanstichen unabhängig von Zahl und Art der einem Puls an derselben Zelle vorauf-gegangenen Pulse zusammengestellt.

Der Wert für die Potentialversetzung wurde nach einem recht willkürlichen Verfahren abgelesen: Die Tangente im Zeitpunkt 12 s nach dem Puls (Potentialaufzeichnung auf dem Schreiber) lieferte die Extrapolation auf den Zeitpunkt des Pulses (s. Abb. 15). Meist lag allerdings nach 12 s in etwa ein Geradenverlauf vor (s.o.).

Durch dieses Verfahren wird also ein eventueller schnellerer Pulseffekt unterschlagen und der Beitrag der größeren Depolarisationen (mutmaßliche DMZ-ausgelöste Leckartefakte) geschwächt.

Mittelwerte der Depolarisationen ΔV_m, krit. Pulsspannung U_p
Für die Mittelwerte der so erhaltenen Depolarisationen ΔV_m in Abhängigkeit von der Pulsspannung ergibt sich bei der Pulsdauer τ_p = 70 µs eine krit. Pulsspannung U_p von 150 - 200 V und ein Betrag um 6 mV, der bis 350 V nicht bedeutend ansteigt (Abb. 16).

Bei geringerem Versuchsumfang wurden auch andere Pulsdauern verwendet (Abb. 16, s. die angegebenen Zell- und Pulszahlen). Es zeigt sich bei 352 µs eine geringere krit. Spannung von etwa 100 V, die sich auch durch τ_p = 1759 µs nicht weiter erniedrigen ließ. Pulse mit $\tau_p \leqq 8{,}8$ µs bewirkten im untersuchten Spannungsbereich keine Depolarisation.

B. Ältere (> 4 h) Zygoten unter Seewasser (KSW) mit 1 mM und 100 mM K^+

In der elektromechanischen Interpretation des DMZ (ZIMMERMANN, 1976) addieren sich das der Membran eigene Potential V_e und das ihr vom Puls aufgeprägte Membranpotential V_p zum krit. Membranpotential V_{krit}. Durch Variieren des Membranpotentials älterer (> 4 h) Zygoten, das nahe dem K^+-Gleichgewichtspotential V_K liegt, über die K^+-Konzentration des Mediums versuchen wir diesen seinen additiven Beitrag zum krit. Membranpotential zu erkennen.

Außerdem fragen wir nach der Höhe des Depolarisationseffekts bei verschieden hohem Membranpotential.

Das Ergebnis (Abb. 17) macht deutlich, daß bei 100 mM K^+ (V_m ca. -20 mV) der Effekt ΔV_m geringer ist als bei 10 mM K^+. Die größere Depolarisation unter 1 mM K^+ kann bei dem geringen Versuchsumfang nicht als gesichert gelten.

Die krit. Spannung scheint unter 100 mM K^+ gleich hoch zu liegen wie unter 10 mM K^+, unter 1 mM niedriger (zwischen 100 und 150 V). Es ist allerdings wieder der geringe Versuchsumfang zu bedenken, bei 100 mM K^+ erschwert außerdem die geringe Höhe der Depolarisation eine gesicherte Aussage.

C. Junge (< 3 h) Zygoten und unbefruchtete Eier

Schwierigkeiten der Potentialmessung am nicht turgeszenten Fucus-Ei. Die Zellwand einer älteren (> 4h) Zygote reagiert beim Aufsetzen einer Mikroelektrodenspitze elastisch nachgebend. Es lassen sich gute, geradelaufende Potentialmessungen erzielen, die allerdings selten länger als 30 min andauern. Offenbar wird die Zelle durch den Turgor von der Nadel gedrückt.

Bei unbefruchteten Zellen ist das Hereinkommen mit einer

Mikroelektrode aufgrund des schlaffen, nicht turgeszenten Zustands der Zelle schwierig. Es kommen kaum stabile, saubere Potentialmessungen zustande, zumal die Potentiale niedrigen Betrag aufweisen. Das gleiche gilt für eben befruchtete Zellen.

Im Verlauf von 1,5 h ist dann schon ein Festerwerden der Zellperipherie zu beobachten, was das Eindringen erleichtert. Außerdem hat dann das Membranpotential meist schon einen höheren Betrag. Die Anstiche liefern aber trotzdem keine so sauberen Potentialmessungen wie die älterer Zygoten, obwohl sie langlebiger sein können. Offenbar führt bei turgeszenten Zygoten ein Durchdringen der Zellwand meist auch zu einem vollen Eindringen ins Cytoplasma und anschließendem Abdichten der Einstichstelle.

Meßergebnisse an jungen (< 3 h) Zygoten und unbefruchteten Eiern. Die auch von anderen Autoren (BENTRUP, 1970; WEISENSEEL und JAFFE, 1972) geschilderten Schwierigkeiten der Messung des Membranpotentials an nicht turgeszenten Zellen behindern das Hervortreten einer krit. Spannung, die einen durch DMZ ausgelösten Pulseffekt von einem unabhängig davon entstehenden Pulsartefakt (Einstichleck, s.o.) unterscheiden könnte (Abb. 18). Wegen des oft unebenen Verlaufs der Potentialaufzeichnung wurde zur Extrapolation der Potentialversetzung auf den Zeitpunkt des Pulses keine Tangente gelegt (s.o.), sondern die Gerade durch die Punkte 3 und 6 s nach dem Puls.

Bei jungen Zygoten traten mit zunehmender Pulsspannung größere Depolarisationen und größere Streuungen auf. Bei einigen Zellen gelang auch mit höheren Pulsspannungen keine Depolarisation. Durch die Beschränkung auf solche Anstiche ergab sich der geringe Wert von ΔV_m im Diagramm für U_p = 550 V. Hier befand sich die Mikroelektrodenspitze wohl nicht sauber im Cytoplasma.

Die Messungen an unbefruchteten Eiern legen einen Depolari-

sationseffekt mit einer kritischen Spannung zwischen 150 und 250 V (für 70 µs-Pulse) nahe. Der Versuchsumfang ist hier allerdings gering. Die Effluxversuche sollen eine zuverlässigere Bestimmung der für den DMZ kritischen Spannung ermöglichen.

3.2.3.
Pulseffekt auf die Ionenabgabe

A. Ioneneffluxohne Anwendung von Pulsen

Methode der Effluxbestimmung aus der abgegebenen Radioaktivität. Da Zygote und Ei von Fucus keine Vakuole besitzen, lassen sie sich als ein intrazelluläres Kompartiment behandeln. Bei kontinuierlicher Eluierung (Rückstrom des radioaktiven Isotops vernachlässigbar) gilt für den radioaktiven Gehalt Q^+ der Zelle das Zeitgesetz

$$Q^+ = Q_o^+ \, e^{-\lambda t}$$

mit der Effluxkonstanten λ und der anfänglich vorhandenen Aktivität Q_o^+, solange der Gesamtgehalt Q des betreffenden Ions und der Efflux konstant sind. Diese Konstanz ist bei unbefruchteten Eiern gegeben, nicht aber bei Zygoten im Falle von K^+ und Cl^- (starke Akkumulation dieser Ionen, s.S.41). Wir legen sie trotzdem ohne bedeutende Verfälschung auch bei Zygoten zugrunde. Dies rechtfertigt sich auch durch den Befund einer Geraden im halblogarithmisch aufgetragenen Zeitverlauf des Aktivitätsgehalts der Zellen.

Diesen Zeitverlauf ("Effluxkinetik") ergibt die rückwärtige Aufsummierung der in den Fraktionen aufgefangenen Aktivitäten auf den Restgehalt der Zellen am Ende der Eluierung. Die Effluxkonstante λ wird als Geradensteigung gefunden. Mit der Anwendung von Pulsen wird bis zur Erreichung dieser

Geraden nach dem Auswaschen der Reste des Inkubationsbads gewartet. (Diese Reste von Badaktivität verhindern auch die Trennung einer eventuellen Zellwandphase von der Badphase.) Multipliziert mit dem Ionengehalt Q und dividiert durch die Zelloberfläche F = 11,31 • 10^{-5} cm (wegen ∅ 70 µ) ergibt die Effluxkonstante λ den flächenbezogenen Efflux des Ions.

Zur Berechnung der Ionenflüsse ziehen wir von anderen Autoren gemessene Konzentrationswerte heran. Wir entnehmen bei ALLEN et al. (1972) für die Fucacee Pelvetia fastigiata einen Wert von 180 mM K^+ bei unbefruchteten Eiern und 300 mM K^+ bei Zygoten im Alter von 5 - 10 h (s.S. 41).

$^{86}Rb^+$ benutzen wir zum Studium der K^+-Abgabe, da Rb^+ von der Membran bezüglich des Transports ähnlich behandelt wird. Die Rb^+-Effluxkonstante repräsentiert für uns auch diejenige für K^+.

Eine relativ geringe Bevorzugung eines der beiden Ionen bewirkt aber während der Inkubation möglicherweise eine divergierende Akkumulation, weshalb wir den aus der Effluxkinetik extrapolierbaren Ausgangsgehalt an $^{86}Rb^+$ nicht zur Berechnung der K^+-Konzentration der Zelle verwenden.

Unsere Berechnung unter der Annahme exakter Gleichbehandlung von Rb^+ und K^+ für einen Zygotenversuch mit genügend langer (1 Tag) Inkubation ergab aber weniger als den doppelten K^+-Konzentrationswert obiger Autoren. Anders gesagt, von den Werten für Pelvetia ausgehend, ergab sich eine gegenüber der Erwartung aus der Gleichbehandlung weniger als verdoppelte Rb^+-Akkumulation bei Fucus serratus.

Effluxwerte bei Eiern und Zygoten. Die Halbwertszeiten ($t_{1/2} = 0{,}693\ \lambda^{-1}$) aus unten dargestellten $^{86}Rb^+$-Versuchen (Abbildungsnummer in Klammern) sind (min):

Bei älteren (> 5 h) Zygoten:
199 (Abb. 19), 244 (Abb. 22), 198 (Abb. 23), 154 (Abb. 25), 201 (Abb. 34), 190 (Abb. 36), 139 (Abb. 37).

Bei unbefruchteten Eiern:
310 (Abb. 24), 482 (Abb. 26), 629 (Abb. 27),
247 (Abb. 40), 377 (Abb. 42).

Bei den Zygoten bedeutet dies K^+-Effluxwerte zwischen 23 und 40 pMol cm^{-2} s^{-1}. Bei den unbefruchteten Eiern sind die Flüsse geringer und streuen stärker (Selektion oder Nivellierung durch Befruchtung?). ROBINSON und JAFFE (1973) maßen übereinstimmend bei unbefruchteten Fucus vesiculosus-Eiern 9,4 pMol cm^{-2} s^{-1} und bei 8 h alten Zygoten von Pelvetia fastigiata 30 pMol cm^{-2} s^{-1}.

B. Ionenabgabe durch Pulse und ihre Bestimmung

Bei kurzen (τ_p = 42 und 211 µs) Entladungspulsen, also im auch zum Effekt aufs Membranpotential verwendeten Pulsdauerbereich, ist ein zusätzlicher Ionenaustritt zu beobachten: Der Zeitverlauf der Abgaberaten (cpm pro 5 min) zeigt in den ersten nach einer Pulsgabe aufgefangenen 5 min-Fraktionen eine Erhöhung (Vers. Abb. 19). Die Effluxkinetik in der halblogarithmischen Darstellung gibt den Abgabeeffekt als eine Versetzung der Effluxgeraden zu erkennen (Abb. 20).

Mit dem Auswaschen der bei der Pulsung abgegebenen Aktivität stellt sich die Gerade neu ein. (Der Zeitverlauf des Ionenaustritts ist wegen der Überlagerung durch den langsamen Auswaschvorgang nicht zu erkennen. Die Vorstellungen über das Zustandekommen des Effekts durch einen DMZ legen einen im Vergleich zur Auswaschdauer schlagartigen Ionenaustritt nahe.) Durch Extrapolation des Aktivitätsgehalts der Zellen mittels dieser Geraden auf den Zeitpunkt der Pulsung läßt sich die Größe der hervorgerufenen Ionenabgabe in cpm - umrechenbar auf die Menge an Rb^+-Ionen - als Differenz zum Aktivitätsgehalt vor dem Puls ermitteln.

Bei geringeren Abgabemengen und entsprechend kleinen Geradenversetzungen ist dieses Verfahren nicht brauchbar. Ge-

nauer läßt sich die Ionenabgabe aus dem Abgaberaten-Verlauf ermitteln, indem die Aktivitäten der nach einer Pulsung aufgefangenen ersten paar Fraktionen summiert werden. Hiervon werden die ohne Puls erwarteten Aktivitäten subtrahiert. Außer durch graphische Schätzung aus dem Raten-Verlauf lassen sich diese wiederum anhand der Effluxkinetik aus extrapoliertem Gehalt und Effluxkonstante nach dem Puls gewinnen.

Die prozentuale Ionenabgabe von radioaktivem plus nicht radioaktivem Isotop ergibt sich durch Division der beim Puls abgegebenen Aktivität durch den vor dem Puls vorhandenen Aktivitätsgehalt. Im Falle von K^+-Rb^+-Gleichbehandlung bezüglich der Bewegung über die Zellgrenze, den wir wieder unterstellen, liefert $^{86}Rb^+$ zugleich die prozentuale K^+-Abgabe.

Im folgenden sind eine Reihe von Versuchen mit $^{86}Rb^+$ und $^{36}Cl^-$ (1 Versuch) zu verschiedenen Aufgabenstellungen dargestellt.

C. Wiederholbarkeit von Rb^+-Abgaben während desselben Effluxversuchs

Der Versuch (Abb. 19) mit den durch die Pulse erzeugten (prozentualen) Abgaben von Rb^+ ("Pulsabgaben") im Diagramm Abb. 21 zeigt, daß sich ein Abgabeeffekt eines einzelnen Pulses ohne starke Änderung der abgegebenen Ionenmenge während derselben Eluierung wiederholen läßt.

Dies ist von Bedeutung für den Vergleich von innerhalb eines Versuchs mit verschiedenen Pulsparametern (Pulsdauer, -spannung, -zahl, -intervall) erzielten Abgaben.

Darüber, inwieweit diese Vergleichbarkeit auch nach ausgiebigeren Pulsungen (großen Abgabemengen, ev. Zellschädigung) gewährleistet ist, geben die unten dargestellten, jeweils innerhalb des Rahmens einer Eluierung erstellten Funktionen der Pulsabgabe von verschiedenen Pulsparametern einigen

positiven Aufschluß.

D. Kritische Spannung anhand der Abgaberaten und des Pulsabgabe-Diagramms

Aus den Raten-Diagrammen von Versuchen mit schrittweise erhöhter Pulsspannung U_p ist eine kritische Spannung U_{krit} für den Abgabeeffekt zu erkennen: Bei 10 µF-Pulsen (Pulsdauer τ_p = 211 µs) zeigte sie sich bei 125 V überschritten, bei 2 µF-Pulsen (Pulsdauer τ_p = 42 µs) bei 150 - 240 V (s. Tab. 1). Um Eindeutigkeit zu erzielen, daß die kritische Spannung bei 10 µF niedriger liegt, wurde in einigen dieser Versuche die kritische Spannung für 10 und 2 µF zugleich sondiert.

Tab. 1: Zusammenstellung der aus den Raten-Diagrammen von Effluxversuchen abgelesenen Minimal(MIN)- bzw. Maximal(MAX)-Werte der krit. Pulsspannung U_{krit} (V) (In Klammern sind die Abb.-Nr. der Pulsabgabe-Diagramme und die daraus extrapolierte Lage von U_{krit} angegeben).

	Zygoten (5 h alt)				unbefr. Eier			
	10 µF		2 µF		10 µF		2 µF	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
V.Abb.23	100	125	175	-				
V.Abb.24	80	120	200	-				
V.Abb.26 (Abb. 29)					100 (100)	120	160	240
V.Abb.25 (Abb. 28)			100 (130)	150				
V.Abb.26 (Abb. 30)							100 (100)	160
V.Abb.27 (Abb. 31)							160 (160)	240
Mittelwert	90	123	158	150	100	120	140	213

Wie die Tabelle zeigt, treten von Versuch zu Versuch beträchtliche Schwankungen in der Lage der kritischen Spannung auf. Zwischen Zygoten und unbefruchteten Eiern ist trotz deutlich verschiedener Abgabemenge (s.u.) kein Unterschied zu erkennen. In der Tabelle sind noch die Mittelwerte der ober- bzw. unterschwelligen Spannungswerte angegeben (bei den Zygoten ist nur in 1 Versuch die kritische Spannung überschritten).

Wenn wir von gleicher Höhe der kritischen Spannung bei Zygoten und Eiern ausgehen, ergibt sich

für $\tau_p = 211\ \mu s$: $U_{krit} = 108$ V

für $\tau_p = 42\ \mu s$: $U_{krit} = 164$ V

(Arithm. Mittel der Minimal- und Maximalwerte gebildet; nur aus den Versuchen, in denen die kritische Pulsspannung überschritten wurde.)

Wegen der Unebenmäßigkeit des Ratenverlaufs ist die Erkennung der Schwellenwerte mit Unsicherheit behaftet. Die quantitative Auswertung - Erstellung der Pulsspannungsfunktion der Rb^+-Abgabe - läßt die Lage der kritischen Spannung sicherer ausmachen. U_{krit} wird durch Anwendung einer Geraden-Extrapolation bestimmt (in der Tabelle samt Abb.-Hinweis in Klammern angegeben).

E. Resümee für die Pulsdauerfunktion der krit. Spannung

Trotz der deutlich verschiedenen Rb^+-Abgaben (s.S. 37) läßt sich bezüglich der kritischen Spannung kein Unterschied zwischen älteren (> 5 h) Zygoten und unbefruchteten Eiern erkennen. Für beide liegt sie mit 211 µs-Pulsen niedriger als mit 42 µs-Pulsen (108 bzw. 164 V).

Davon ausgehend, daß für große Pulsdauern ein unterer Grenz-

wert der kritischen Spannung besteht und sie für gegen 0 gehende Pulsdauer ∞ groß wird, erscheint uns für die Pulsdauerfunktion ein Kurvenverlauf mit einem Grenzwert erheblich niedriger als dem für 211 µs erhaltenen Wert der kritischen Spannung wenig wahrscheinlich, da das Maximum der Steigungsänderung weit unterhalb 211 µs liegen muß (Abb. 32).

F. Rb^+-Abgabe bei schrittweise erhöhter (überkritischer) Pulsspannung

Ein sofortiger Übergang in die Sättigung ist schon wegen möglicher individueller Schwankungen der kritischen Spannung in der Versuchspopulation nicht zu fordern.

Aus dem Pulsabgabe-Diagramm (Abb. 30) des obigen Versuchs Abb. 26 läßt sich ersehen, daß für einen einzelnen 42 µs-Puls der Abgabeeffekt von 600 auf 900 V sich nicht mehr steigern ließ. Es existiert aber kein von der Pulsdauer unabhängiges Sättigungsniveau, denn der anschließende 211 µs-Puls von 860 V setzt mehr Rb^+ frei.

G. Rb^+-Abgabe unter Seewasser mit 100 mM K^+

In 2 Versuchen wurde mit 100 statt 10 mM K^+ im künstlichen Seewasser eluiert (V. Abb. 33; V. Abb. 34 mit Pulsabgabe-Diagramm Abb. 35). Die Zellen waren in 10 mM K^+ inkubiert worden.

Die kritische Spannung lag in beiden Fällen zwischen 100 und 160 V (42 µs-Pulse).

Die Abgabemenge ließ sich bei weiteren überkritischen Pulsungen nicht in ähnlicher Weise steigern wie in den Versuchen mit 10 mM K^+-KSW.

Im Versuch Abb. 34 ergab sich außerdem ein von Pulsung zu Pulsung gesteigerter Efflux (steilere Effluxkinetik). Es

kann sich also nicht um einen von der Pulsung unabhängigen Schädigungseffekt der 100 mM K^+-Exposition, die für die Zellen möglicherweise belastend ist, handeln.

Die Zellen zeigten am Ende der Eluierung ein inhomogenes Aussehen, im Versuch Abb. 33 sämtliche Zellen, im Versuch Abb. 34 etwa 30 %.

H. Rb^+-Abgabe von Zygoten und unbefruchteten Eiern bei 1-facher und 10-facher Pulsung, Fehlerbemerkung

Tab. 2: Zusammenstellung der durch 1-fache und 10-fache (Pulsabstand 30s) 2 µF(42 µs)-Pulsungen der Spannung U_p = 350 V in einer Reihe von Versuchen bewirkten prozentualen Rb^+-Abgaben aus Fucus-Eiern bzw. -Zygoten.

	Zygoten (>5 h alt)		unbefr. Eier	
	1-fach	10-fach	1-fach	10-fach
V. Abb. 21	10 %			
V. Abb. 36	18 %			
V. Abb. 25		40 %		
V. Abb. 37		33 %		
V. Abb. 26			1 %	3,6 %
V. Abb. 27			0,5 %	5,7 %
V. Abb. 42			1,9 %	8,5 %
Mittelwert	14 %	37 %	1,1 %	5,9 %

Bezüglich der Höhe der Rb^+-Abgabe ist der Vergleich zwischen turgorfreien unbefruchteten Eiern und älteren, schon turgeszenten Zygoten von besonderem Interesse (s. Einleitung). Die Tabelle stellt die durch überkritische (350 V, 42 µs) 1-fach- und 10-fach-Pulsungen erzielten Rb^+-Abga-

ben aus einer Reihe von Versuchen zusammen. (Sie soll weiter unten auch zur Diskussion der Pulszahlabhängigkeit herangezogen werden.)

Die Pulse setzen aus den Zygoten erheblich mehr Rb^+ frei: Die Abgaben durch eine 1-fache Pulsung verhalten sich wie 13:1, die einer 10-fachen wie 6:1 (Mittelwerte benützt).

Von Versuch zu Versuch traten allerdings bei gleichen oder ähnlichen Bedingungen erhebliche Schwankungen auf, auch bei großen, vom Hintergrund der Effluxratenschwankung deutlich abgehobenen Pulsabgaben. (Dagegen war innerhalb eines Versuchs die Höhe der Abgabe gut reproduzierbar (vgl. Abb. 21).)

I. Rb^+-Abgabe gerade befruchteter Zygoten

Abb. 38 mit dem Pulsabgabe-Diagramm Abb. 39 zeigt einen Versuch an Zellen, denen erst während des Auswaschens eine Suspension männlicher Gameten zugegeben wurde. Die innerhalb der ersten 2 h nach der Befruchtung erzielten Rb^+-Abgaben 10-facher Pulsungen lagen deutlich unter denen unbefruchteter Zellen, wie sich anhand der 350 V-Abgaben vergleichen läßt. (Die 350 V-Pulsung kurz nach Befruchtung ergab eine noch geringere Abgabe als die spätere.)

Diese im Vergleich zu unbefruchteten Zellen niedrigen Pulsabgaben ließen sich in einem von 2 weiteren Versuchen reproduzieren, in dem anderen nicht. Möglicherweise mißlang im letzten Fall die Befruchtung des Großteils der Zellen wegen des schlechten Zustands der Gameten. Wir halten aber den Verdacht aufrecht, daß die Befruchtung vorübergehend zu verminderten Pulsabgaben führt.

J. Abhängigkeit der Rb^+-Abgabe von Pulszahl und -abstand

Über das Verhältnis zwischen der Rb^+-Abgabe von 1-fachen zu derer von 10-fachen Pulsungen gibt Tab. 2 (S. 37) Aufschluß. Weiter sind die Versuche Abb. 40 und Abb. 42 (Pulsabgabe-Diagramme Abb. 41 bzw. 43) zum Studium der Pulszahlfunktion angelegt, letzterer kombiniert mit der Variation des Zeitintervalls bei der Pulszahl 10 von 30 s über 10 auf 3 s, ohne daß sich die Abgabe bedeutend änderte. (Das im allgemeinen angewandte Zeitintervall bei Mehrfachpulsungen betrug 30 s.)

Versuch Abb. 44 zeigt den durch eine 60-fache Pulsung in Abstand 1 s an Zygoten erzielten Abgabeeffekt. (Bei diesem Versuch sahen die Zellen allerdings am Ende durchweg inhomogen aus.) Für die Rb^+-Abgabe kann nur ein Mindestwert von 51 % angegeben werden, da die Aktivitätsmengen der Fraktionen recht niedrig lagen und mit einem Beitrag von Resten des Inkubationsbads zum Aktivitätsgehalt in der Küvette gerechnet werden muß (s.S. 18).

Bei der Beurteilung einer durch eine mehrfache Pulsung erzielten Rb^+-Abgabe ist zu berücksichtigen, daß von Teilpuls zu Teilpuls ein sukzessiv verringerter Aktivitätsgehalt den Gesamtgehalt des betreffenden Ions repräsentiert. Es bietet sich der Vergleich mit dem "Idealfall" der Konstanz der prozentualen Abgabe p_i und des Änderungsfaktors $1 - p_i = q_i$ des Aktivitätsgehalts für alle Teilpulse. Für eine Pulsserie der Anzahl n Teilpulse i ist in diesem Fall der Änderungsfaktor q des Aktivitätsgehalts $q = (q_i)^n$.

Die Rb^+-Abgabe von mehrfachen Pulsungen liegt bei älteren Zygoten und auch bei unbefruchteten Eiern deutlich unter dieser Erwartung. An älteren (> 5 h) Zygoten ergab die 10-fache 42 µs-Pulsung mit 350 V 37 %, die 1-fache Pulsung 14 % (i.e. ein Verhältnis von 2,6:1). Aufgrund obiger Erwartung hätte die 10-fache Pulsung einen um den Faktor $q = (1-0,14)^{10} = 0,22$ gesenkten Aktivitätsgehalt ergeben müssen, also eine Abgabe von 78 %.

In unbefruchteten Eiern ergab die 10-fache 42 µs-Pulsung mit 350 V eine Rb^+-Abgabe von 5,9 %, die 1-fache Pulsung 1,1 % (i.e. ein Verhältnis von 5,4:1). Bei konstanter Abgabe durch die Teilpulse wäre bei der 10-fachen Pulsung ein um den Faktor $q = (1-0{,}011)^{10} = 0{,}895$ gesenkter Aktivitätsgehalt zu erwarten gewesen, also eine Abgabe von 10,5 %.

Die Versuche Abb. 40 und Abb. 42 liefern dieselbe Analyse bezüglich der "Idealerwartung".

K. Versuch mit $^{36}Cl^-$

Bei $^{36}Cl^-$ besteht eine wesentlich ungünstigere Situation für die Aufladung als bei $^{86}Rb^+$. Die Cl-Innenkonzentration übertrifft nicht um ein Vielfaches die Außenkonzentration und die Spezifität (Radioaktivität pro Mol Cl^-) im Inkubationsbad ist wegen der sehr geringen Zerfallskonstante (große Halbwertszeit) begrenzt.

Im einzigen Versuch mit $^{36}Cl^-$, Abb. 45, an einer 1 Tag vorher befruchteten Zellpopulation, was eine lange Inkubation erlaubte, brachte eine 30-fache 42 µs-Pulsung mit 350 V einen Abgabeeffekt von mindestens 16 % (wegen der niedrigen Abgaberaten der Aktivität aus den Zellen - unbekannter Beitrag der Reste des Inkubationsbads - kann wieder nur ein Mindestwert angegeben werden).

Der Efflux war nach der Pulsung größer (steilere Effluxkinetik (ohne Abb.)), spätere Pulsungen bewirkten nur noch geringe Abgaben und die Zellen sahen am Ende des Versuchs inhomogen aus. (Die 30-fache Pulsung an unbefruchteten Zellen hatte nicht zu einer sichtbaren Schädigung geführt (V. Abb. 42), dagegen die >10-fache Pulsung an älteren Individuen (s.a. V. Abb. 44). Dies hängt wohl mit deren turgeszentem Zustand zusammen (größerer Stoffaustritt).)

Die voraufgegangene 28-fache 42 µs-Pulsung mit 50 V Pulsspannung erwies sich wie bei Rb^+ als unterkritisch.

4.
DISKUSSION

4.1.
Entwicklungsgeschichte des Fucus-Eies

In unseren Untersuchungen verfolgen wir die Entwicklung des einzelligen Stadiums von Fucus serratus bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Zygote im Zuge der Ausbildung der Thallus-Rhizoid-Polarität ihre Kugelgestalt aufgibt.

Das unbefruchtete Fucus-Ei ist von keiner Zellwand umgeben, ohne Turgor und isoosmolar mit dem Seewasser. Den größten Teil der Ionen in der Zelle machen K^+ und Cl^- aus (ALLEN et al., 1972). Das Membranpotential liegt bei -20 mV und erheblich positiver als das K^+-Gleichgewichtspotential $V_K = - 58 \log \frac{K_i}{K_a} = - 73$ mV (BENTRUP, 1970; WEISENSEEL und JAFFE, 1972).

In den ersten Stunden nach der Befruchtung wird die Zellwand aufgelagert, worauf der Turgor ständig ansteigt. Es findet eine Akkumulation von K^+ und Cl^- statt. K_i^+ ist bei Befruchtung 180 mM und verdoppelt sich bis zum Ende der Einzellphase. Nach 2 - 3 h setzt der Anstieg ein und erreicht bald (nach 8 h) 300 mM, einen Wert, den wir für die ältere (> 4 h) Zygote zugrundelegen. Cl^- ist anfänglich um 87 mM, nach 8 h 194 mM und am Ende 310 mM. Der Turgor beginnt nach 3 h von null auf schließlich 250 milliosmol $\cdot l^{-1}$ anzusteigen. Diese Werte sind von ALLEN et al. (1972) für die Fucacee Pelvetia fastigiata erhalten und werden von ROBINSON und JAFFE (1973) auch bei Fucus für anwendbar befunden.

Offenbar in Verbindung mit dieser Akkumulation steigt die K^+-Permeabilität in Relation zu anderen Ionen, denn das Membranpotential V_m erreicht schließlich ungefähr das V_K von nunmehr - 86 mV (in 10 mM K^+). Variation der K^+-Konzentration des Mediums ändert dann das V_m ähnlich den V_K-Werten (BENTRUP, 1970; WEISENSEEL und JAFFE, 1972).

Über den Vorgang der Bildung der Rhizoidanlage besteht wenig Klarheit. Der sichtbaren Vorwölbung der Zellwand im Alter von ca. 15 h gehen erst kurz vorher Anzeichen der Änderung in der Verteilung der Organellen und Zelleinschlüsse voraus (QUATRANO, 1972). Nach neueren Vorstellungen, für die einige Indizien beigebracht werden konnten, treten am künftigen Rhizoidpol Ca^{++}-Ionen ein und erzeugen im darunterliegenden Cytoplasma ein elektrisches Feld, das wiederum Vesikel und andere Komponenten zur Leckstelle transportieren kann. Auf diese Weise könnte das lokale Wachstum an der Vorwölbungsstelle stabilisiert und verstärkt werden (JAFFE, 1968; JAFFE et al., 1974). Offensichtlich spielen transcytoplasmatische elektrische Felder in lebenden Systemen eine nicht unbedeutende morphogenetische Rolle (JAFFE, 1977). In der von BENTRUP (1974) erhobenen Hypothese führt dagegen lokal erhöhter Protonenexport - durch Nachgiebigmachen der Zellwand - zur Rhizoidanlage. Dies ist die Übertragung der Hypothese von HAGER et al. (1971) über die morphogenetische Bedeutung differentiellen Protonenexports auf das Niveau der einzelnen Zelle.

Im Alter von ca. 20 - 24 h, erhebliche Zeit nach der sichtbaren Vorwölbung, wird senkrecht zur derart markierten Polaritätsachse die Zellwand der ersten - inäqualen - Zellteilung in Rhizoid- und Thalluszelle eingezogen. Eine Vakuolisierung der Zygote ist nicht beobachtet.

4.2.
Untersuchungen zur Photoinduktion der Polarität

4.2.1.
Vorbemerkungen zur Polaritätsinduktion bei Fucus und Equisetum

Die Frage der Kontrolle der Zellpolarität stellt sich besonders klar bei Objekten, deren Entwicklung freie einzellige, zunächst nicht erkennbar polare Stadien aufweisen, neben der Braunalge Fucus z.B. auch dem Schachtelhelm Equisetum.

Beim Fucus-Ei und der Equisetum-Spore besitzen eine Reihe von gerichteten Außenfaktoren, z.B. Licht und Elektrizität, einen determinierenden Einfluß auf die Stelle der Zellperipherie, an der der Rhizoidpol angelegt wird (Polaritätsinduktion) (HAUPT, 1962; JAFFE 1968).

Trotz des wohl sehr verschiedenen Ablaufs der Rhizoidpolausbildung - die Entwicklung der Equisetum-Spore liegt noch weit mehr im Dunkeln - besteht aber eine Gemeinsamkeit mit dem Fucus-Ei hinsichtlich der Suszeption der in Form von Licht gebotenen Umweltinformation: Die Photorezeptoren liegen in der Zellperipherie, ihre Schwingungsebenen (Hauptübergangsmomente) parallel zur Zelloberfläche (periklin).

Dies geht bei beiden Objekten aus dem Vergleich der Reaktionen auf unpolarisiertes und linear polarisiertes Licht hervor. Unpolarisiertes Licht induziert den Rhizoidpol an der Stelle schwächsten Lichterhalts (negativer Phototropismus). Dies müssen wir auch für polarisiertes Licht annehmen. Das Zustandekommen des der Reaktion auf polarisiertes Licht entsprechenden Absorptionsgradienten ist nur durch die perikline Anordnung der Schwingungsebenen der Photorezeptoren möglich (Abb. 5) (JAFFE, 1958; JAFFE und ETZOLD, 1962).

Die Photorezeptoren zeigen also dichroitisches Verhalten

(Abhängigkeit der Absorption von der Schwingungsebene des Lichts infolge bevorzugter Orientierung der Photorezeptoren).

Gemeinsamkeit zwischen Fucus-Ei und Equisetum-Spore besteht wohl auch in der Natur der Photorezeptoren, wie die Aktionsspektren zeigen, und in den Dosiseffektkurven, deren Verlauf in 2 Anstiegen mutmaßlich durch photooxidative Inaktivierung (Refraktärverhalten) und Intensitätsbedarf der Photorezeptoren entsteht: Mit Erhöhung des absoluten, nicht des relativen Intensitätsgradienten wird wahrscheinlich der Absorptionsgradient wegen der zuerst in der Region maximalen Lichterhalts einsetzenden Photoinaktivierung der Rezeptoren eingeebnet. Bei höheren Intensitäten ermöglicht dann anscheinend eine 2. Primärreaktion, welche auch andere Photorezeptoren besitzt, den Wiederanstieg. Werden nur geringe Intensitäten verwendet, aber große Expositionsdauern, zeigt die Dosiseffektkurve einen einfachen Sättigungsverlauf. (HAUPT, 1957; BENTRUP, 1963; BENTRUP, 1964)

Bisher bleibt - wie bei allen pflanzlichen Lichtorientierungen - offen, ob die Photorezeptoren im Plasmalemma oder einem anderen Bereich der Zellperipherie liegen.

Ein Indiz für die Beteiligung des Plasmalemmas an der Polaritätsinduktion liefert die Analyse der Wirkung elektrischer Reize. Wird die Zelle einem elektrischen Strom ausgesetzt, so liegt wegen des hohen Widerstands im Vergleich zum übrigen Cytoplasma der weitaus größte Teil der Potentialdifferenz über der Zelle am Plasmalemma (BENTRUP, 1968). (s.S. 53) Aufgrund des Vorhandenseins einer Reaktion auf Wechselfelder im Bereich von 100 ms schließen wir weitgehend aus, daß nur transcytoplasmatische Elektrophorese größerer Komponenten (s.S. 42) als Reiz wirkt. Diese Zeiträume reichen nicht aus, um wenigstens größere Moleküle das Cytoplasma durchqueren zu lassen (NOVAK, 1972; NOVAK und BENTRUP, 1973). Die Zellperipherie, und hier kommt nur das Plasmalemma in Frage, muß also den Reizgradienten tragen. Als wirksamen Reiz vermuten wir weniger den Stromfluß durch die

Membran, welcher sie auflädt und ihr ein elektrisches Feld aufzwingt, sondern die aufgrund dieses Felds an Ladungen in der Membran angreifenden Kräfte.

4.2.2.

Prüfung der K^+-Abhängigkeit der Photoinduktion: Orientierung der Photorezeptoren durch das elektrische Feld der Membran?

Hypothese zu Lokalisation und Dichroismus der Photorezeption.
Bezüglich des Dichroismus und der mutmaßlichen Lokalisation der Photorezeptoren im Plasmalemma erhob BENTRUP (1974) folgende Hypothese: Die Photorezeptoren befinden sich im Feld des Membranpotentials, d.h. in der Schicht des Plasmalemmas, in der ein starkes elektrisches Feld besteht (zum Potentialprofil der Membran s.S. 52).Die Höhe des Membranpotentials muß ausgenutzt werden, um die Photorezeptoren ähnlich wie Dipole im elektrischen Feld auszurichten, wodurch die perikline Anordnung ihrer Schwingungsebenen zustandekommt.

Wir vermuten ja überhaupt eine Funktion des Membranpotentials in der Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Membranstruktur.

Nach dieser Hypothese müßte eine Senkung des Membranpotentials zu einem Orientierungsverlust (Relaxation) der Photorezeptoren führen. Dies würde den Absorptionsgradienten im Falle von linear polarisiertem Licht schwächen, nicht dagegen im Falle von unpolarisiertem Licht (BENTRUP, 1974; Abb. 5): Eine Senkung des Betrags des Membranpotentials durch Erhöhung der K^+-Konzentration des Mediums während der Belichtung hätte also - nur bei polarisiertem Licht - einen weniger steilen Anstieg der Dosiseffektkurve zur Folge.

Orientierung der Photorezeptoren bei kurzfristiger Änderung des elektrischen Membranfelds. Als Ergebnis unserer Versuche mit kurzer (1 s - 1 h) Belichtung und auf die Belichtung beschränkter K^+-Exposition (Änderung von K_a^+ im Medium von 10 auf 100 mM, d.h. von V_m von ca. - 80 mV auf - 55 mV bzw. - 30 mV) ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Dosiseffektkurve von polarisiertem Licht (Abb. 6 und 7).

Halten wir trotzdem an obiger Hypothese fest, so ist die Schwächung des elektrischen Membranfelds offenbar nicht langdauernd genug, um Desorientierung der Photorezeptoren zu erreichen.

Deswegen soll in K^+-Langexpositionen geprüft werden, ob die Photorezeptoren (Dipole) verzögert - behindert etwa von benachbarten Membranelementen - auf die Feldänderung reagieren.

Orientierung der Photorezeptoren bei langfristiger Änderung des elektrischen Membranfelds. Auch die Versuche mit langer (6 h) Belichtung und gleichzeitiger K^+-Exposition (30 mM) ergaben keinen Effekt auf die Dosiseffektkurve von linear polarisiertem Licht (Abb. 8).

Fazit für Lokalisation und Dichroismus der Photorezeption. Unsere Ergebnisse für linear polarisiertes Licht bestätigen also nicht die obige Hypothese der Ausrichtung der Photorezeptoren durch das elektrische Feld über der Membran. Dies bezieht sich aber nur auf die Photorezeptoren niedrigen Intensitätsbedarfs, die am ersten Anstieg der Dosiseffektkurve beteiligt sind, da der zweite Anstieg, welcher in der Spezies der Photorezeptoren verschieden ist (BENTRUP, 1963), nicht erreicht wurde (Abb. 6).

Damit muß auch die für viele lichtabhängige pflanzliche Orientierungsprozesse postulierte Photorezeption am Plasmalemma weiterhin als experimentell unbewiesen betrachtet werden.

Frage eines K^+-Effekts bei unpolarisiertem Licht. Auch bei der Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht ergab sich für die Dosiseffektkurve kein Effekt einer gleichzeitigen 30 mM-K^+-Exposition, weder bei kurzer Belichtung (1 s - 1 h, in den zweiten Anstieg hineinführend, Abb. 9), noch bei 6 h-Belichtung (Abb. 10). Ein solcher wäre aus obiger Hypothese auch nicht zu erwarten.

Allerdings hatte BENTRUP (1974) bei 6 h-Belichtung das Auftreten eines ausgeprägten Zwischenminimums unter 30 mM K^+ konstatiert. Dies erwies sich durch den Umfang unserer Versuche als nicht reproduzierbar.

4.2.3.
Zeitfunktion der Störung eines gerichteten durch einen ungerichteten Lichtreiz bei Equisetum

In diesen orientierenden Versuchen zur Photopolaritätsinduktion an der Equisetum variegatum-Spore suchen wir nach einer "Gedächtnis"-Funktion in der von der Suszeption zur Reaktion führenden Kausalkette, also nach einem den eigenen Struktur- und Funktionszustand konservierenden Verhalten beteiligter Reaktionselemente. Die mögliche Rolle des Plasmalemmas bei der Polaritätsinduktion ist hier nicht unmittelbar angesprochen.

Einem Reizgradienten (einseitiges unpolarisiertes Licht) soll eine ungerichtete Verteilung der Reizintensität überlagert werden, wobei sich der relative, nicht der absolute Gradient verringert.

Gleichzeitige Gabe mit Variation des ungerichteten Reizes. Das Ergebnis bei gleichzeitiger Gabe beider Reize zeigt, daß sich - wie zu erwarten - der absolute Gradient in seiner Wirkung einebnen läßt (Abb. 11). Auch die Intensität des nötigen Störreizes hält sich im Rahmen der Erwartung: zur vollen Unterdrückung muß der Störreiz mindestens von der Grö-

ßenordnung des gerichteten Reizes sein. Gleiche Intensität bedeutet Halbierung des relativen Reizgradienten.

Zeitversetzte Gabe. Nun wurde in einer Reihe von Versuchen - bei allerdings recht niedrigem Orientierungswert für den gerichteten Reiz - die Zeitrelation zwischen beiden Reizen variiert und als erster Reiz der ungerichtete gegeben. Es ergab sich hierbei das Verschwinden der dämpfenden Wirkung dieses Störreizes bei zeitversetzter Gabe (am signifikantesten bei einem Zeitabstand von 4 min) (Abb. 12).

Deutungsversuch. Die 1. mögliche Erklärung für diesen Befund ist zunächst die durch das Refraktärverhalten der Photorezeptoren vorgetäuschte Zeitfunktion: Der ungerichtete Reiz bewirkt durch zusätzliche Inaktivierung von Photorezeptoren eine Schwächung des vom gerichteten Reiz erzeugten Absorptionsgradienten, wenn an der Stelle maximalen Lichterhalts die Flächendichte der nicht refraktären Photorezeptoren sich erheblich verringert. Bei genügend langem Zeitintervall zwischen beiden Reizen - im Bereich der Refraktärzeit (4 min?) - wäre diese zusätzliche Inaktivierung nicht gegeben. (Die Reihenfolge der Reize würde hier keine Rolle spielen.) Es bliebe aber die Schwächung des relativen Absorptionsgradienten durch den ungerichteten Reiz bestehen, die nach unserem Versuchsergebnis somit wider Erwarten wirkungslos wäre. Dies spricht gegen diese 1. Interpretation, ebenso wie unsere Bemühung, unterhalb des Maximums des ersten Anstiegs der Dosiseffektkurve des gerichteten Reizes zu arbeiten, welchem ja mutmaßlich Inaktivierung der Photorezeptoren zugrundeliegt.

Die übrigbleibende 2. mögliche Erklärung ist - als eigentliche Zeitfunktion - die Abhängigkeit der Reaktion vom Zeitverlauf der Entstehung des Absorptionsgradienten. Welches könnte nun die Art dieser zeitlichen Verrechnung sein?

Eine zentrale, die gesamte in der Zellperipherie suszipier-

te Information bündelnde Verrechnung erscheint wenig naheliegend. Wahrscheinlicher ist eine Interaktion der von den einzelnen Suszeptionsorten ausgehenden Reaktionsketten. Eine zeitliche Verrechnung käme also durch Interaktion der zu verschiedenen Zeitpunkten gestarteten Reaktionsketten zustande.

Geschieht diese Interaktion nur zwischen von benachbarten Suszeptionsorten ausgehenden Reaktionsketten, so ist sie als gemeinsames Einwirken auf im Unterschuß vorhandene Reaktionselemente auf einer Ebene der Reaktion anzunehmen. Die Dominanz der später gestarteten Reaktionsketten - vgl. unser Versuchsergebnis - kann hierbei nur erklärt werden, wenn diese die früher begonnenen "einzuholen" und die betreffenden Reaktionselemente "umzustimmen" vermögen. Es ist also ein Verharren auf einer Ebene der Reaktion gefordert ("Gedächtnisfunktion").

Auf diese Weise stützt unser Befund - läßt er sich durch weitere Versuche auch mit vertauschter Reihenfolge beider Reize bestätigen - die Vorstellungen über die Lokalisation der Suszeption und der ersten Reaktionsschritte in einem Bereich der Zellperipherie mit der Fähigkeit zur Konservierung des Struktur- und Funktionszustands in ihm befindlicher Elemente, einer Fähigkeit, welche wir dem Plasmalemma zuzuschreiben geneigt sind.

4.3.
Untersuchungen zum Dielektrischen Membranzusammenbruch (DMZ) am Fucus-Ei

4.3.1.
Tatsachen zum DMZ, Intentionen bei Fucus

Der Dielektrische Membranzusammenbruch (DMZ) ist der Effekt kurzer Strom-Feld-Pulse im Bereich der Ladungsdauer (RC-Zeit) der Membran. Er wurde erstmals bei ZIMMERMANN et al. (1973) beschrieben.

Der DMZ äußert sich in elektrischen Messungen - an Valonia utricularis - als plötzliche Widerstandssenkung in Abhängigkeit von der Höhe der Verschiebung des Membranpotentials V_m beim Puls: Die lineare Stromspannungskennlinie der Membran bei kurzen Pulsen existiert nur bis zu einem kritischen V_m, bei dem der Strom hohe Werte annimmt (COSTER und ZIMMERMANN, 1975a). Die Widerstandssenkung zeigt sich auch beim externen Hinüberleiten eines kurzen elektrischen Stromes im geringeren Gesamtwiderstand der Zelle (Versuche im Coulter Counter an Escherichia coli, Ochromonas und Erythrozyten, ZIMMERMANN et al., 1974a und b).

Charakteristisch für den DMZ ist auch seine Wiederholbarkeit ohne erkennbare Schäden für die Zelle nach genügend langem Zeitintervall (im Bereich einiger Sekunden), das die Membran für das Ausheilen (resealing) benötigt. Bei kürzeren Zeitabständen wurde bei Valonia eine rapide Zellschädigung beobachtet (COSTER und ZIMMERMANN, 1975a).

Ein Folgeeffekt des DMZ ist die Bewegung von Stoffen über die Zellgrenze. Es läßt sich der Übertritt von Ionen, aber auch größeren Molekülen (Hämoglobin, Bildung von "Ghostzellen" bei Erythrozyten) beobachten. Der Stoffübertritt geschieht mit denselben kritischen Membranpotentialen wie bei den elektrischen Parametern, offensichtlich Folge eines vom DMZ im Plasmalemma vorübergehend hinterlassenen Lecks

(RIEMANN et al., 1975).

Elektromechanisches Modell des DMZ. Der DMZ wird anhand der mechanischen und elektrischen Kräfte auf die Membran interpretiert (COSTER und ZIMMERMANN, 1975b): Die zusammenpressende elektrische Kraft

$$P_E = \frac{\varepsilon \varepsilon_o V_m^2}{2 l^2}$$

neben der Turgorkraft P_T einerseits und die rücktreibende elastische Kraft

$$P_M = Y \ln \frac{l}{l_o}$$

stehen sich im Gleichgewicht gegenüber: $P_E + P_T + P_M = 0$

(Es bedeuten: ε_o : Influenzkonstante des Vakuums
ε : Dielektrizitätskonstante der Membran
V_m : Potentialdifferenz über der Membran
l : Dicke der Menbran
l_o : Membrandicke ohne Anwesenheit zusammenpressender Kräfte
Y : Elastizitätsmodul für Verschiebungen senkrecht zur Membranoberfläche).

Bei Erhöhung der zusammenpressenden Kräfte wird mit abnehmender Membrandicke l ein Instabilitätspunkt erreicht, wenn die elektrische Kraft P_E aufgrund ihrer Proportionalität zum reziproken Quadrat der Membrandicke stärker anwächst als die rücktreibende Kraft P_M: Ein Gleichgewicht kann sich nicht mehr einstellen: $|P_E + P_T| > P_M$

Mit diesem Modell läßt sich unter Wahl realistischer Werte für ε und l_o aus dem gemessenen kritischen Membranpotential des DMZ ein Elastizitätsmodul der Membran schätzen, der für eine merkliche Beeinflussung der Membrandicke durch

den gewöhnlichen Turgor ausreicht (COSTER und ZIMMERMANN, 1976). Die Turgorabhängigkeit des kritischen Membranpotentials V_{krit} ließ sich bestätigen (ZIMMERMANN et al., 1976), ebenso seine Temperaturabhängigkeit, die nach Überlegungen von COSTER und ZIMMERMANN ebenfalls aus dem Modell heraus zu fordern ist (COSTER und ZIMMERMANN, 1974b).

Das Membranpotential V_m ist in der quantitativen Behandlung des Modells als linear über die Membran abfallend angesehen (konstantes Feld E_m). Mehr Wahrscheinlichkeit besitzen dagegen Vorstellungen, die einen stark ungleichförmigen transversalen Verlauf von E_m annehmen. In COSTERs "double fixed charge"-Membranmodell liegt der Steilabfall des Membranpotentials im Innern des Plasmalemmas (COSTER, 1973a und b). Das elektromechanische Modell ließe sich also auf diese Schicht des Plasmalemmas mit annähernd konstantem, hohem Feld E_m beziehen.

Abgrenzung des DMZ vom Durchschlagen (punch through) der Membran, einem Effekt längerer Pulse. Vom DMZ abzugrenzen ist der als Durchschlagen ("punch through") schon bekannte weitere Effekt der Erhöhung des elektrischen Felds E_m der Membran (COSTER, 1965 und 1969; vgl. auch BENTRUP, 1975). Hierbei steigert sich die Ionenleitfähigkeit der Membran drastisch und es findet ein massiver Ionendurchmarsch statt. Voraussetzung dafür ist eine Verschiebung des Ionenprofils der Membran. Hierfür muß die Ladungsdauer τ_m der Membran erheblich überschritten werden (in COSTERs Versuchen an Chara corallina um mindestens 0,1 s). Ein Durchschlagen tritt andererseits auch bei geringerem Betrag des Membranpotentials auf als der DMZ in den bisher untersuchten Fällen.

Intentionen von DMZ-Untersuchungen am Fucus-Ei. Der DMZ als - reversible - Membranstörung bietet sich also als Werkzeug zur Diagnose von Eigenschaften der Zelle an, in erster Linie der Zellmembran (Elastizität und Belastbarkeit).

Unser Interesse und unsere Intentionen bei DMZ-Untersuchungen am Fucus-Ei als entwicklungsbiologischem Objekt sind schon in der Einleitung angedeutet. Es geht uns um die sich bietenden Möglichkeiten der weiteren Analyse des DMZ und seines Folgegeschehens, als auch die Anwendung des DMZ zur Diagnose von Zelleigenschaften im Entwicklungsverlauf.

Als Indikatoren des DMZ bieten sich der relativ hohe Betrag des Membranpotentials älterer Zygoten (bei Valonia sind es einige mV) und der Efflux von $^{86}Rb^{+}(K^{+})$ an, für den angesichts der hohen K^{+}-Konzentration der Zelle ($>$ 180 mM gegenüber 10 mM im Medium) eine genügend hohe Aufladung zu erwarten ist.

Fucus-Ei oder -Zygote erlauben als nicht vakuolisierte Zellen, den DMZ von einem Tonoplasten unbehindert zu studieren. Der von einem Tonoplasten getragene Potentialabfall würde einen unbekannten Anteil an der zum Erreichen einer bestimmten Potentialdifferenz über dem Plasmalemma nötigen Pulsstärke erfordern. Außerdem könnte auch am Tonoplasten ein DMZ auftreten, ohne daß dies durch einen Stoffübertritt bemerkt würde oder in elektrischen Messungen mit in die Vakuole eingeführter Mikroelektrode von einem DMZ am Plasmalemma zu unterscheiden wäre.

Unsere Methode zur Erzeugung des DMZ ist die oben erwähnte Anwendung kurzer externer Strompulse, die wir durch Entladung einer Kapazität herstellen. Das in ihrem homogenen Feld E_p den durch die Feldrichtung markierten Zellpolen aufgeprägte Membranpotential beträgt aufgrund der für eine sphärische Zelle gelösten Laplaceschen Gleichung (Cytoplasma- und Medium-Leitfähigkeit groß gegen die des Plasmalemmas):

$$V_p = 1{,}5 \; r \; E_p$$

wo r der Zellradius (35 µ) bedeutet und die Feldstärke E_p als Quotient aus der Pulsspannung U_p (bei Beginn des Pulses)

und dem Abstand der ebenen Pulselektroden gegeben ist (ZIMMERMANN et al., 1974a).

Diese Beziehung gilt für Pulse, deren Dauer die volle Aufladung der Membran ermöglicht, bevor der Puls schon beträchtlich abgeklungen ist. Dies ist in unseren Versuchen nicht gewährleistet, in denen wir ja bestrebt sind, die Ladungsdauer τ_m der Membran nicht unnötig zu überschreiten, um ein Durchschlagen (punch through) zu vermeiden. Wir können aber die Pulsdauerabhängigkeit der kritischen Pulsspannung U_{krit} bestimmen und aus dem mit zunehmender Pulsdauer sich abzeichnenden unteren Grenzwert von U_{krit} das wahre aufzuprägende Membranpotential $V_{p,krit}$ gewinnen. Die Variation der Pulsdauer ist überdies ein Mittel gerade zur Sondierung der RC-Zeit der Membran.

Unsere Versuchsziele sind im folgenden nochmals dargelegt (vgl. Einleitungs- und Ergebnisteil).

1) Versuch der Bestätigung des elektromechanischen Modells des DMZ. Haben die entwicklungsabhängig (Turgor, V_m) und experimentell (V_m über die K^+-Konzentration des Mediums) variablen Kräfte auf die Membran einen merklichen Einfluß auf das aufzuprägende kritische Membranpotential $V_{p,krit}$?

Dies hängt außer von der Genauigkeit unserer Bestimmung von der Größe der zum DMZ nötigen zusammenpressenden Kraft ab. Bei einem kritischen Membranpotential V_{krit} im Bereich der ca. 850 mV von Valonia utricularis (COSTER und ZIMMERMANN, 1975a), den wir auch bei Fucus für möglich halten, würde die entwicklungsbedingte Zunahme des Betrags des der Membran eigenen Potentials V_e der Fucus-Zygote von 20 auf 80 mV das vom Puls zu erzeugende Membranpotential $V_{p,krit}$ um nur 7 % senken. Ähnliches gilt für die Senkung des Betrags von V_e der älteren Zygote von 80 auf 30 mV durch Verschiebung des K^+-Gleichgewichtspotentials V_K (Änderung der K^+-Konzentration des Mediums von 10 auf 100 mM).

Desgleichen hatte sich die drastische Variation des Turgors

von Valonia utricularis bei dieser Höhe von V_{krit} nur in dessen Änderung um weniger als 10 % ausgewirkt (ZIMMERMANN et al., 1976).

Es ist fraglich, ob unsere gegenwärtigen Methoden solche Änderungen sichtbar machen können.

2) Entwicklungsverlauf des kritischen Membranpotentials. Im geänderten Transportverhalten tritt ein Funktionswandel der Membran während der Entwicklung zutage, der mutmaßlich auch den Einbau oder die Betätigung von weiteren Funktionselementen in die Membran mit sich bringt. Ändert sich durch diese, in ihrem Ausmaß unbekannte, Ausstrukturierung der Membran ihre Belastbarkeit bezüglich der elektrischen und mechanischen Kompression, wie sie sich im kritischen Membranpotential ausdrückt? Diese Änderung könnte eine der im elektromechanischen Modell auftretenden Membraneigenschaften betreffen (s.o.): Neben dem Elastizitätsmodul Y die Membrandicke 1_o und die Dielektrizitätskonstante ε.

3) Entwicklungsverlauf der Pulsdauerfunktion der kritischen Spannung. Da wir bestrebt sind, die Ladungsdauer τ_m der Membran zu sondieren, gelangen wir dabei in Pulsdauerbereiche, die zum Erreichen des DMZ eine größere kritische Pulsspannung U_{krit} (Spannung zwischen den Pulselektroden bei Beginn des Entladungspulses) erfordern als längere Pulse. Denn das Maximum der Membranaufladung und der Verschiebung des Membranpotentials wird erst erreicht, wenn der Puls schon beträchtlich abgeklungen ist.

Verlagert sich nun im Verlauf der Entwicklung dieser Pulsdauerbereich, in dem die kritische Pulsspannung stark von der Pulsdauer abhängt, so deutet dies auf geänderte RC-Zeit der Membran hin, also auf Entwicklungsabhängigkeit der Kapazität oder des Widerstands der Membran. Vor allem für den Widerstand liegt angesichts der für unbefruchtete Eier und ältere Zygoten unterschiedlichen Permeabilitätsverhältnisse

der Membran eine Änderung nahe.

4) Entwicklungsabhängigkeit des Ionenübertritts. Aus dem Vergleich der Ionenabgabe älterer, turgeszenter Zygoten und turgorfreier unbefruchteter Zellen erhoffen wir uns einen Aufschluß über den Charakter der Stoffbewegungen. Eine Turgorabhängigkeit würde erstmals den Charakter eines Massenflusses ("bulk flow") und damit die Schädigung der Barrierenfunktion der Membran bestätigen.

5) Prüfung des reversiblen Charakters (Fehlen einer Schädigungswirkung) des DMZ für die gesamte Zelle anhand der Keimrate. Die Reversibilität des DMZ bezieht sich in erster Linie auf die Regeneration der Membran (resealing). Unterhalb der sichtbar letalen Zellschädigung (inhomogenes Aussehen) gestattet die Fucus-Zygote anhand der den Entwicklungserfolg anzeigenden Keimung eine differenziertere Prüfung der langfristigen Wirkung auf die Zelle.

4.3.2.
Effekt eines DMZ auf das Membranpotential

Mögliches Zustandekommen. Für einen Effekt eines DMZ auf das Membranpotential sehen wir nur 2 Möglichkeiten des Zustandekommens, die beide auf eine Depolarisation hinauslaufen.

1) Der DMZ muß einen lokalen Zusammenbruch des elektrischen Felds über der Membran an der Stelle der Zellperipherie bedeuten, an der Membranpotential V_m und elektrisches Membranfeld E_m beim Puls am größten sind (derjenige der beiden Zellpole maximalen aufgeprägten Membranpotentials V_p mit gleichem Vorzeichen zum Eigenpotential V_e der Membran). Inwieweit sich diese Feldstörung für die gesamte Potentialdifferenz zwischen innen und außen bemerkbar macht, hängt von ihrer räumlichen Ausdehnung ab.

2) Am Stoffaustritt im Anschluß an einen DMZ ist eine dem Anteil an der stofflichen Zusammensetzung der Zelle mindestens entsprechende Beteiligung des K^+ zu fordern. Eine genügend große Verringerung der K^+-Innenkonzentration K_i und damit des K^+-Gleichgewichtspotentials V_K könnte die Membran merklich depolarisieren.

In beiden Fällen ist der Betrag der Depolarisation als abhängig vom Absolutwert des Membranpotentials zu erwarten. Dies soll anhand der Variation der Membranpotentials (über V_K bzw. K_a^+) geprüft werden.

Das Interesse gilt auch dem Zeitverlauf des eventuellen Effekts. Eine durch Feldstörung zustandekommende Depolarisation sollte nach der gemäß den Befunden an Valonia (COSTER und ZIMMERMANN, 1975) im Bereich von 10 s vermuteten "resealing"-Zeit verschwinden.

DMZ und Membranpotential bei älteren (> 4 h) Zygoten. Das Ergebnis unserer Versuche, mit kurzen (häufigste Pulsdauer τ_p = 70 µs) Entladungspulsen einen Effekt auf das Membranpotential V_m hervorzurufen, läßt tatsächlich oberhalb einer kritischen Pulsspannung (zwischen 150 und 200 V) eine Depolarisation ΔV_m erkennen.

Bei Zygoten unter 10 mM K^+ im Seewasser (KSW) beträgt ΔV_m ca. 6 mV (Abb. 16 und Abb. 17).

Die kritische Pulsspannung U_{krit} erniedrigt sich mit steigender Pulsdauer (Abb. 16). Die angedeutete Pulsdauerfunktion U_{krit} (τ_p) geht bei 352 µs in einen unteren Grenzwert von etwa 100 V über (s.S. 27).

Bei durch Änderung von 10 auf 100 mM K^+ von ca. - 80 auf - 30 mV geschwächtem Membranpotential ist die Depolarisation deutlich kleiner. Sie hängt also, wie oben erwartet, von der Höhe des Membranpotentials ab (U_{krit} wurde unverändert gefunden). (Abb. 17)

Der nur schwach gesicherte Befund unter 1 mM K^+ - Verdoppelung der Depolarisation bei Änderung des Membranpotentials von ca. 80 auf 110 mV - geht allerdings über diese Erwartung hinaus. Ebenso überträfe die dort gefundene Erniedrigung der kritischen Spannung von ca. 50 V das aus dem elektromechanischen Modell des DMZ (ZIMMERMANN, 1976) geforderte Maß (s. Diskussion des Ionenabgabeeffekts S. 62). Ein solcher Befund - ließe er sich absichern - wäre vielleicht durch strukturelle Änderungen der Membran (der "elektromechanischen Belastbarkeit" durch V_m und den Turgor) bei hohem Membranpotential zu deuten.

Der Erholungsverlauf des Effekts (ca. 1 min) (Abb. 14) könnte gut das "resealing" der Membran mit der Wiederherstellung des elektrischen Felds an der Störstelle wiedergeben.

Das Zustandekommen der Depolarisation über die geänderte K^+-Konzentration der Zelle (geändertes V_K) läßt sich aber nicht ausschließen.

Die späteren Ioneneffluxversuche sollen anhand der dort gefundenen $Rb^+(K^+)$-Abgaben beim Puls diese Interpretationsmöglichkeit prüfen (s.S. 65).

4.3.3.

Effekt eines DMZ auf die Ionenabgabe

A. Kritische Spannung - Vergleich mit Membranpotential-Effekt

Ein Ionenabgabeeffekt kurzer elektrischer Pulse - von ähnlicher Dauer wie die am Membranpotential angewandten Pulse - konnte auch bei Fucus gefunden werden.

Er ist - angesichts der verwendeten kurzen Pulsdauern, die die Ladungsdauer τ_m der Membran nicht wesentlich überstei-

gen dürften (s.S. 52) - der auf die Membran ausgeübten Kraft des elektrischen Felds E_m zuzurechnen und bietet sich als weiterer, von der elektrischen Messung unabhängiger Indikator für den Vorgang des DMZ an.

Wie die Depolarisation tritt die Ionenabgabe nur oberhalb einer gewissen Spannung auf.

In der Lage dieser kritischen Spannung U_{krit} wurde zwischen unbefruchteten Eiern und älteren (> 5 h) Zygoten im Rahmen unseres Versuchsumfangs kein Unterschied gefunden. Bei der Pulsdauer τ_p = 42 µs lag sie höher als bei den längeren Pulsen mit τ_p = 211 µs: U_{krit} = 164 V bzw. 108 V.

Auch beim Membranpotential-Effekt - von 70 µs-Pulsen - hatte sich für Zygoten ein U_{krit} zwischen 150 und 200 V ergeben. Dies bestätigt seine Interpretation auf der Basis des DMZ. Bei unbefruchteten Eiern gestattet der Ionenabgabeeffekt die zuverlässigere Bestimmung der kritischen Spannung des DMZ.

B. Pulsdauerfunktion der kritischen Spannung, RC-Zeit der Membran von Zygoten und unbefruchteten Eiern

Für hinreichend niedrige Pulsdauern ist eine Erhöhung der kritischen Spannung zu erwarten, da die Membran ihre maximale Aufladung erst während des Abklingens erreicht. Für diese Pulsdauerfunktion U_{krit} (τ_p) der kritischen Spannung haben wir nur 2 Werte: Von 211 µs auf 42 µs macht U_{krit} einen Sprung von 108 auf 164 V, ohne erkennbaren Unterschied für ältere (> 5 h) Zygoten und unbefruchtete Eier.

Offenbar sind wir mit diesen Pulsdauern in den Bereich der Ladungsdauer (τ_m) der Membran geraten und haben diese in der Tat nicht bedeutend überschritten. Die RC-Zeit liegt demnach bei Zygoten und Eiern im Bereich von 100 µs.

In Abb. 32 ist ein mutmaßlicher Grenzwertverlauf von U_{krit}

(τ_p) angenommen, wie er sich übereinstimmend auch beim Effekt aufs Membranpotential nahegelegt hatte (Abb. 16).

Widerstand R_m und Kapazität C_m der Membran bei älteren Zygoten und unbefruchteten Eiern. Offenbar bewirkt also in Zygoten die große Steigerung der K^+-Permeabilität in Relation zu anderen Ionen keine Verringerung des gesamten elektrischen Widerstands der Membran, wenn wir eine wenig plausible entwicklungsabhängige Änderung der Membrankapazität außer acht lassen. Mit dem von WEISENSEEL und JAFFE (1972) gefundenen Wert von 1 $\mu F\ cm^{-2}$ für die Membrankapazität kommt man auf einen Membranwiderstand der Größenordnung 100 ohm cm^2.

Aufgrund ihrer, an nicht turgeszenten Zellen naturgemäß weniger eindeutigen (s.S. 28), Widerstandsmessungen mittels Mikroelektroden hatten WEISENSEEL und JAFFE (1972) für unbefruchtete Zellen einen gegenüber Zygoten um einen Faktor von ca. 8 geringeren Wert angegeben. Neuere Befunde sprechen aber übereinstimmend mit uns gegen einen unterschiedlichen Membranwiderstand (WEISENSEEL, persönl. Mitteilung; vgl. auch WEISENSEEL und JAFFE, 1974).

C. Kritisches Membranpotential bei Zygoten und unbefruchteten Eiern

Wie oben dargelegt, repräsentiert der Spitzenwert (Pulsspannung U_p) eines Abklingpulses nicht das von der Membran gesehene maximale Membranpotential, sofern seine Dauer im Bereich der RC-Zeit der Membran liegt. Erst der untere Grenzwert der Pulsdauerfunktion U_{krit} (τ_p) der kritischen Spannung liefert das wahre aufgeprägte kritische Membranpotential.

Aus diesem Grenzwert, den wir mit 100 V angeben können (Abb. 32), ergibt die Laplacesche Beziehung an den Zellpolen (Oberfläche senkrecht zur Feldrichtung) das durch

die äußere Feldstärke $E_p = U_p \cdot l^{-1}$ (Elektrodenabstand l = 1 cm) aufgeprägte kritische Membranpotential

$$V_{p,krit} = 1{,}5\ r\ E_p = 525\ mV$$

(Zellradius r = 35 µ).

Durch Addition des Betrags des Eigenpotentials V_e der Membran (ältere Zygoten ca. - 80 mV, unbefruchtete Eier - 20 mV) erhält man das kritische Membranpotential V_{krit} = 605 bzw. 545 mV.

D. Mögliche Effekte bei längerer Pulsdauer

Der Grenzwertverlauf der Pulsdauerfunktion U_{krit} (τ_p) kann bei hinreichend hoher Pulsdauer erheblich über der Ladungsdauer (τ_m) der Membran durch ein Durchschlagen (punch through) der Membran abgebrochen sein. Möglicherweise kommt auch bei für den DMZ überkritischen genügend langen Pulsen ein durch die anhaltende Stromexposition bedingter Folgevorgang des DMZ zuvor.

Für einen 20 ms langen Puls, den sie mit einer Mikroelektrode injizierten, erhielten WEISENSEEL und JAFFE (1972) bei einer Verschiebung des Membranpotentials auf einen Betrag von 200 - 300 mV einen Depolarisationseffekt. Dies liegt unter dem von uns gefundenen kritischen Membranpotential des DMZ. Es handelt sich demnach um ein Durchschlagen, das, wie auch bei anderen Objekten, unterhalb des kritischen Membranpotentials des DMZ auftritt, wenn der Puls lange genug andauert: Der untere Grenzwert der kritischen Spannung des DMZ liegt über der zum Durchschlagen der Membran mindestens erforderten Pulsspannung. Dadurch sind beide Effekte experimentell besser zu unterscheiden.

E. Bestätigung des elektromechanischen Modells des DMZ?

Fehlen einer signifikanten Entwicklungsabhängigkeit des kritischen Membranpotentials. Das gefundene V_{krit} von 605 mV bei Zygoten erscheint zu groß, um den additiven Beitrag des Eigenpotentials der Membran in der kritischen Pulsspannung U_{krit} spürbar werden zu lassen: Bei unbefruchteten Eiern mit ihrem um ca. 60 mV niedrigeren Membranpotential ist eine Erhöhung der kritischen Pulsspannung (100 V) um 11 V zu erwarten.

Zum Nachweis dieser Änderung erscheint unsere Methode bei der geringen Zahl von Versuchen nicht genau genug.

Ähnliches gilt für den Zellturgor. Die zum DMZ nötige Kraft auf die Membran ist offensichtlich erheblich größer als die in älteren Zygoten vom Turgor ausgeübte. Dies entspricht der relativ schwachen bei Valonia gefundenen Turgorabhängigkeit des kritischen Membranpotentials (ZIMMERMANN et al., 1976).

Kritische Pulsspannung unter 100 mM K^+. Sowenig wie die entwicklungsbedingte Änderung des Membranpotentials kann seine Senkung um ca. 50 mV durch Verwendung von 100 mM K^+-Medium die kritische Pulsspannung merklich erhöhen. Die Laplacesche Beziehung liefert wieder nur eine Erhöhung von 100 auf 110 V, die sich durch unsere beiden Versuche nicht signifikant machen läßt.

Fazit. Die - absolut gesehen - drastischen Änderungen von Membranpotential und Turgor während der Zygotenentwicklung bzw. im Experiment führten zu keiner signifikanten Änderung der kritischen Pulsspannung. Dieser Befund stimmt mit den quantitativen Aussagen des elektromechanischen Modells von ZIMMERMANN überein: Die auf verschiedene Weise hervorgerufenen kompressiven Kräfte auf die Membran addieren sich zur für den DMZ nötigen kritischen Kraft. Deren Höhe verhindert

bei der verfügbaren Variationsbreite des Membran-Eigenpotentials und des Turgors eine quantitative Bestätigung des Modells. Andererseits ergeben sich für die Eimembran keine grundlegend von den bekannten Zellmembranen verschiedenen elektromechanischen Eigenschaften.

F. Einfluß der Zellentwicklung auf die Membranstruktur?

Der in der Entwicklung stattfindende Funktionswandel und die damit verbundene Aus- bzw. Umstrukturierung der Membran führt offenbar nicht zu einer drastischen Änderung der "elektromechanischen Belastbarkeit" der Membran, wie sie im kritischen Membranpotential zum Ausdruck kommt, und daher auch nicht zu einem für uns merklichen Unterschied in der kritischen Pulsspannung zwischen unbefruchteten Eiern und älteren Zygoten.

Demnach bestimmt dieser Funktionswandel nicht das physikalische Gesamtverhalten der Membran (was sich auch für die RC-Zeit schon gezeigt hatte). Dies mag ein Hinweis sein auf die absolut gesehen geringe Dichte der Dotierung der Membran-Grundstruktur mit Funktionselementen.

G. Rb^+-Abgabe bei Zygoten und Eiern, Turgorabhängigkeit indiziert Massenfluß

Die durch überkritische Pulsungen gleicher Pulszahl (1 bzw. 10 Pulse) bewirkte Rb^+-Abgabe ist bei älteren (> 5 h) turgeszenten Zygoten deutlich höher als bei unbefruchteten Eiern (s.S. 37). Bei einem Einzelpuls ergab sich grob eine Abgabe von 14 % gegenüber 1,1 % bei unbefruchteten Eiern (Verhältnis 13:1), bei einer 10-fachen Pulsung 37 % bzw. 5,9 % (Verhältnis 6:1).

Rolle des Turgors beim Stoffaustritt. Die Stoffbewegungen über die Membran sind offensichtliche Folge eines Lecks,

das der DMZ vorübergehend lokal hinterläßt. Die Barrierenfunktion der Membran ist zumindest für einen Teil der Ionen beeinträchtigt, wenn auch offenbar die Reflexionskoeffizienten nicht in jedem Fall verschwinden (RIEMANN et al., 1975).

Die Beeinträchtigung dieser Barrierenfunktion muß zu einem Massenfluß (bulk flow) über die Zellgrenze führen.

Insoweit nur Ionen, nicht aber größere Moleküle oder Cytoplasma austreten, wird dies möglicherweise durch eine restliche Barrierenwirkung des Plasmalemmas, den Strukturzusammenhalt des Cytoplasmas oder die Zellwand verhindert.

Dieser Massenfluß wird natürlich durch den Zellturgor gefördert.

Der beim Fucus-Ei gefundene Unterschied in der Rb^+-Abgabe von unbefruchteten Eiern und Zygoten zeigt also die Beeinträchtigung der semipermeablen Barriereneigenschaften und den Massenflußcharakter der Stoffbewegungen an.

Mögliche Rolle der Zellwand beim Stoffaustritt. Es ist denkbar, daß aus unbefruchteten Zellen wegen des Fehlens einer Zellwand beim Puls Cytoplasma mit austritt. Ein Cytoplasmaaustritt macht sich aber gegenüber der Rolle des Turgors im Verhältnis der Rb^+-Abgaben von älteren Zygoten und unbefruchteten Eiern nicht zugunsten der letzteren bemerkbar. Er findet offenbar nicht statt, zumal er unter dem Mikroskop - in den Membranpotential-Versuchen - nicht beobachtet werden konnte. Auch die Bildung inhomogen aussehender Zellen trat bei unbefruchteten Eiern nicht bevorzugt auf. - Die Zellwand ist also, zumindest bei turgorfreien Zellen, kein entscheidendes Hindernis für den Cytoplasmaaustritt.

H. Rb^+-Abgabe gerade befruchteter Zygoten

Die Rb^+-Abgaben frisch (< 3 h) befruchteter Zellen liegen nicht über denen unbefruchteter (s.S. 38). Damit stimmt überein, daß der Beginn der Turgorentwicklung von ALLEN et al. (1972) erst nach einigen Stunden gefunden wurde, wenn die Zellwandausbildung genügend fortgeschritten ist.

Der - vorläufige - Befund der gegenüber unbefruchteten Eiern sogar erniedrigten Rb^+-Abgabe könnte einen möglichen Grund in einer rapiden Veränderung der Zellperipherie nach der Befruchtung haben (Befruchtungs-"Membran").

I. Interpretation des Membranpotential-Effekts anhand der Rb^+ (K^+)-Abgabe

Dem Effekt kurzer Pulse auf das Membranpotential hatten wir zwei Interpretationen offengehalten: 1) Senkung des Membranpotentials durch den Zusammenbruch des elektrischen Felds über der Membran an der Stelle des DMZ. 2) Depolarisation der Membran durch Verschiebung des K^+-Gleichgewichtspotentials aufgrund der nach dem Austritt von Stoffen geringeren K^+-Konzentration der Zelle.

Die von uns gefundene Rb^+-Abgabe aus älteren (> 5 h) Zygoten in der Höhe von 14 % bedeutet in der 2. Interpretation eine Änderung des Membran- bzw. K^+-Gleichgewichtspotentials von 4 mV, die den tatsächlich gefundenen 6 mV recht gut entspricht.

Auf jeden Fall fordern diese Abgabewerte eine merkliche Änderung des Membranpotentials, solange die K^+-Konzentration der Zelle vor dem Puls nicht wiederhergestellt wird.

Da der Depolarisationseffekt nur eine vorübergehende Änderung des Membranpotentials darstellt, folgt, daß nach seinem Abklingen die frühere K^+-Konzentration in der Zelle wieder vorliegt. Dies ist auch für 10-fache Pulsungen zu

fordern, da bei ähnlichen Serien von Pulsen das Membranpotential ebenfalls erhalten blieb.

Die Wiederherstellung der K^+-Konzentration kann entweder durch rapide K^+-Neuaufnahme oder - vielleicht gar nicht so abwegig - Volumenverkleinerung durch Kontraktion der Zelle geschehen.

J. Sekundäre Einflüsse des DMZ und kurzer Pulse

Rb^+-Abgabe bei schrittweiser Erhöhung der Pulsspannung (1-fache und 10-fache Pulsungen). Abb. 30 zeigte uns das Fehlen eines von der Pulsdauer unabhängigen Sättigungsniveaus der Rb^+-Abgabe eines einzelnen Pulses (s.S. 36). Hieraus ist zu schließen, daß die Etablierung der Schadstelle in der Membran zumindest teilweise zu den durch die anhaltende Stromexposition bedingten Folgeprozessen des DMZ gehört. Zur bloßen Auslösung des DMZ genügt ein gegenüber der Pulsdauer und der Ladungszeit (τ_m) der Membran sehr kurzes Überschreiten des kritischen Membranpotentials.

Es muß offenbleiben, wieweit bei deutlich überkritischem Puls oder auch einer mehrfachen Pulsung eine solche fortschreitende Verstärkung des Lecks eine Rolle spielt.

Wiederholbarkeit von Rb^+-Abgaben. Aus der Wiederholbarkeit von überkritischen Pulsungen an Zygoten mit z.T. sich steigernder Rb^+-Abgabe von beträchtlicher Höhe (s. z.B. Abb. 28) ist die Wiederherstellung nicht nur des Plasmalemmas, sondern auch des Zellturgors im Zeitintervall zwischen 2 Pulsungen (1/2 - 1 h) zu schließen.

Rb^+-Abgabe unter 100 mM K^+-KSW bei schrittweiser Erhöhung der Pulsspannung. Diese Wiederholbarkeit ist unter 100 mM K^+ im Seewasser nicht in ähnlicher Weise gegeben (Abb. 34). Offenbar gelingt nicht die Wiederherstellung des Turgors

oder die Reparatur der Lecks in der Membran. Auf das letztere deutet auch das Auftreten der bleibenden Effluxerhöhungen nach der Pulsung und des inhomogenen Zellaussehens.

Anscheinend sind unter 100 mM K^+ die beim Puls gesetzten Plasmalemma- oder Cytoplasmaschädigungen stärker oder die Wiederherstellung des Plasmalemmas wird behindert.

Das erstere würde eine - aus anderen Untersuchungen ohnehin angenommene - komplizierende Abweichung von einer reinen Massenfluß-Vorstellung des Ionenübertritts bedeuten. RIEMANN et al. (1975) hatten ja den Austritt größerer Moleküle (Hämoglobin) im Anschluß an einen DMZ als abhängig von Ionenverhältnissen und den verbleibenden semipermeablen Membraneigenschaften (Reflexionskoeffizienten) vermutet.

K. Pulsintervallfunktion der Rb^+-Abgabe

Gibt es eine Zeit nach einem Puls, während der ein weiterer Puls keinen erneuten DMZ bewirkt: während dem Ausheilen (resealing) des Plasmalemmas?

Versuch Abb. 42 mit Pulsabgabe-Diagramm Abb. 43 zeigt für 10-fache Pulsung, daß zwischen 3, 10 und 30 s Pulsabstand kein drastisch verschiedener Abgabeeffekt vorliegt.

In Versuch Abb. 44 erbrachte eine 62-fache Pulsung mit 1 s Pulsabstand ebenfalls keine Rb^+-Abgabe unter der Erwartung für längere Pulsabstände.

Bedeutet dies, daß die resealing-Zeit den Bereich von 1 - 3 s nicht überschreitet? Möglicherweise spielt aber auch eine mit der wiederholten Pulsgabe fortschreitende Folgeschädigung ohne jeweiligen DMZ eine Rolle.

L. Pulszahlfunktion der Rb^+-Abgabe

Die Abgabemengen von mehrfachen Pulsungen bei befruchteten und unbefruchteten Zellen liegen deutlich unter der Erwartung aus dem "Idealfall" für jeden Teilpuls konstanter prozentualer Rb^+-Abgabe (s.S. 39).

Eine Erklärung für diese Abweichung bietet die Turgorabhängigkeit des Stoffaustritts an: Es tritt weniger aus, weil der Turgor nach den 30 s bis zum folgenden Puls noch nicht wieder hergestellt ist.

Möglicherweise spielt auch die Erschöpfung des freien, verfügbaren Rb^+ (K^+) in der Zelle eine Rolle.

Bei unbefruchteten Zellen entfallen beide Möglichkeiten wegen des Fehlens eines Turgors und der geringen Abgabemenge, bei der eine Erschöpfung des freien Rb^+ (K^+) nicht in Frage kommt. Eine mögliche Erklärung ist die auf einen Zellbezirk beschränkte Erschöpfung des für den Massenstrom verfügbaren Zellmaterials im an der Stelle des wiederholten DMZ (Zellpol maximalen Membranpotentials beim Puls) gelegenen Cytoplasma.

M. Cl^--Abgabe

Die Tatsache, daß sich auch für ein anderes Ion wie Cl^- (1 Versuch mit $^{36}Cl^-$ an 1 Tag alten Individuen, Abb. 45) eine beträchtliche Abgabe (> 16 % für eine 30-fache 42 µs Pulsung mit 350 V) erzielen ließ, entspricht wiederum der Massenstromvorstellung und stimmt mit den Untersuchungen an anderen Objekten zum parallelen Austritt verschiedener Ionen nach einem DMZ überein.

4.3.4.
Einfluß eines DMZ an jungen Zygoten auf deren Keimrate

Nachdem wir mit beiden Indikatoren des DMZ - Membranpotential und Ionenabgabe - die kritische Spannung und ihre Abhängigkeit von der Pulsdauer sondiert haben, läßt sich sagen, ob die Pulsexposition junger (< 3 h) Zygoten in unserem Keimratenversuch (Abb. 13) tatsächlich zu einem DMZ geführt hatte.

In der Tat muß mit der gewählten Pulsdauer von 36 µs die kritische Pulsspannung ähnlich wie für die 42 µs in den Effluxversuchen liegen, also nicht über wenigen 100 V. Die Keimrate weist aber bis 6000 V keine Beeinträchtigung auf.

Ein DMZ an jungen, noch nicht turgeszenten Zygoten behindert also die weitere Entwicklung bis zur Keimung nicht und hinterläßt keine bedeutsame physiologische Schädigung.

Erst oberhalb 6000 V tritt offensichtlich eine irreversibel schädigende Pulswirkung auf: der Anteil der nicht gekeimten und der zerstörten Zellen nimmt zu. Unterhalb der Letalschwelle zeigt die Keimrate keine Entwicklungsschädigung an. Es dürfte sich hierbei um einen "vandalistischen" Folgeprozeß in Verbindung mit der nach dem DMZ noch erfahrenen hohen Stromexposition handeln.

4.3.5.
Fazit der Untersuchungen zum DMZ

Das Fucus-Ei erweist sich als ein zur weiteren Aufklärung und zur diagnostischen Anwendung des DMZ geeignetes Objekt.

Die Spezifität des DMZ als Mechanismus, über den die kurzen Pulse in das Zellgeschehen eingreifen, wird durch die gute Reproduzierbarkeit der Pulseffekte - vor allem an ein und denselben Zellen - betont.

Die reversible Qualität des DMZ (Wiederherstellung der Membran und die Fähigkeit der Zelle, einen DMZ unbeschadet zu überstehen) ließ sich im Falle junger Zygoten und eines einzigen Pulses anhand der Keimfähigkeit bestätigen. Im übrigen dient auch das inhomogene Aussehen der Zelle als Indikator der - irreversiblen - Schädigung. Eine solche Veränderung wurde an älteren (> 5 h) turgeszenten Zygoten nach vielfacher (> 10) Pulsung beobachtet. Dies erscheint im Zusammenhang mit der durch Pulse bewirkten großen Stoffabgabe turgeszenter Zygoten verständlich.

Die Höhe des kritischen Membranpotentials des DMZ liegt mit 0,605 V im Vergleich mit den bisher untersuchten Fällen den 0,85 V der Riesenzelle von Valonia utricularis am nächsten (Ochromonas malhamensis: 2,8 V, menschliche Erythrozyten: 1,3 V, Rindererythrozyten: 1,4 V, Escherichia coli: 1,1 V; sphärische Approximationen aus ZIMMERMANN et al., 1974 a und b), und ist bei unserem tonoplastenfreien Objekt dem Plasmalemma zuzuordnen.

Eine schlüssige Bestätigung des elektromechanischen Modells von ZIMMERMANN erweist sich als nicht möglich. In diesem Modell gesprochen: Die in dem - vergleichsweise eher niedrigen - kritischen Membranpotential zum Ausdruck gelangende Höhe der kritischen kompressiven Kraft auf die Membran hält die relativen Beiträge anderer Kräfte als der elektrostriktiven des Pulses gering. Unsere Methoden sind für die Erkennung dieser Beiträge nicht genau genug. Man kann aber in der Invarianz von V_{krit} gegenüber der doch drastischen Variation des Turgors oder des Membranpotentials eine Übereinstimmung mit diesem elektromechanischen Modell sehen.

Das Fehlen einer signifikanten Entwicklungsabhängigkeit des kritischen Membranpotentials V_{krit} und der Pulsdauerfunktion der kritischen Pulsspannung U_p spricht für die geringe Bedeutung der mit den nachweislichen und mutmaßlichen drastischen Funktionsänderungen der Membran verbundenen Strukturänderungen für die physikalischen Eigenschaften der

Membran als Ganzes ("elektromechanische Belastbarkeit" der Membran durch V_m und Turgor, gegeben durch Y, ε, l_o; RC-Zeit der Membran).

Die Entwicklungs- (i.e. Turgor-) -Abhängigkeit der $Rb^+(K^+)$-Abgabe zeigt den Massenfluß durch ein vom DMZ hinterlassenes Leck an.

Der Effekt kurzer Pulse aufs Membranpotential zeigt, daß das Membranpotential während der Zeit des mutmaßlichen Bestehens des DMZ-Lecks ("resealing-Zeit") nur gering an Höhe verliert und bestätigt somit den lokalen Charakter des DMZ. In Verbindung mit dem $Rb^+(K^+)$-Abgabeeffekt ist zu vermuten, daß diese geringe Depolarisation maßgeblich durch den K^+-Verlust der Zelle nach dem DMZ zustandekommt (Verschiebung des K^+-Gleichgewichtspotentials V_K durch Verringerung der K^+-Konzentration der Zelle). Außerdem ist aus der Wiederherstellung des Membranpotentials (innerhalb ca. 1 min) auch die der K^+-Konzentration der Zelle vor dem Puls zu fordern.

5.
ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Induktion der Thallus-Rhizoid-Polarität an der Zygote der marinen Braunalge Fucus serratus durch Licht wurde unter Änderung der K^+-Konzentration des künstlichen Seewassers (i.e. des Membranpotentials V_m) beobachtet. Eine signifikante K^+-Abhängigkeit wurde weder bei unpolarisiertem noch bei linear polarisiertem Licht gefunden. Damit ließ sich eine Hypothese von BENTRUP (1974) nicht erhärten und die Lokalisation der Photorezeptoren im Plasmalemma bleibt weiter unbewiesen.

2 a) Extern applizierte, kurze Strompulse (Abklingdauer $\tau_p < 100\ \mu s$) bewirken eine vorübergehende Depolarisation des mit Mikroelektroden gemessenen Membranpotentials V_m (ca. - 80 mV) der älteren (> 4 h) Fucus-Zygote um ca. 6 mV und eine durch Kompartimentsanalyse zu bestimmende Abgabe von $^{86}Rb^+(K^+)$ aus Ei oder Zygote.
Beide - reversiblen - Pulseffekte lassen eine kritische elektrische Pulsfeldstärke erkennen. Für deren Pulsdauerfunktion $E_{krit}\ (\tau_p)$ legt sich ein unterer Grenzwert von 100 V cm^{-1} nahe, gleichermaßen für ältere Zygoten wie unbefruchtete Eier. (Bei unbefruchteten Eiern (turgorfrei!) ist die $^{86}Rb^+(K^+)$-Abgabe erheblich geringer, Tab. 2 S. 37) (Abb. 16, Abb. 32).

b) Die Wirkung der kurzen Pulse auf V_m und $^{86}Rb^+(K^+)$-Abgabe wird als Indiz für eine vorübergehende elektromechanische Instabilität der Zellmembran, den "Dielektrischen Membranzusammenbruch (DMZ)" nach ZIMMERMANN (et al.) (1973 ff) gedeutet. Ein Durchschlagen ("punch through") der Membran (COSTER, 1965 und 1969) schließen wir aus, da die verwendeten Pulsdauern die Aufladezeit der Membran ($\tau_m \approx 100\ \mu s$) nicht erheblich überstiegen.

c) Aus dem unteren Grenzwert von 100 V cm^{-1} für E_{krit} erhalten wir ein extern erzeugtes kritisches Membranpotential von 525 mV. Zusammen mit dem Eigenpotential der Membran bil-

det dieses das kritische Membranpotential V_{krit}, das im Bereich der von ZIMMERMANN et al. gefundenen Werte für andere Zellmembranen (z.B. Valonia) liegt.
Die Gleichheit des bei Zygoten und unbefruchteten Eiern gefundenen V_{krit} zeigt, daß der entwicklungsbedingte Funktionswandel der Membran ihre Belastbarkeit durch das elektrische Feld der Membran und den Zellturgor nicht drastisch ändert.

d) Zur umfassenden quantitativen Überprüfung des elektromechanischen Modells der Membran von ZIMMERMANN anhand von entwicklungsbedingter und experimenteller Variation des membraneigenen Potentials und des Turgors erwiesen sich unsere Methoden wegen der Höhe von V_{krit} als nicht genau genug.
Die vorgelegten Daten lassen aber auch den Schluß zu, daß das Modell ohne wesentliche Änderungen auf eine nicht-vakuolisierte Pflanzenzelle anwendbar ist.

6.

LITERATUR

ALLEN, R.D., JACOBSEN, L., JOAQUIN, J. and JAFFE, L.F.: Ionic concentrations in developing Pelvetia eggs. Develop. Biol. 27, 538-545, 1972

BENTRUP, F.W., MEYER ZU: Vergleichende Untersuchungen zur Polaritätsinduktion durch das Licht an der Equisetum-Spore und der Fucus-Zygote. Planta 59, 472-491, 1963

BENTRUP, F.W., MEYER ZU: Zur Frage eines Photoinaktivierungs-Effektes bei der Polaritätsinduktion in Equisetum-Sporen und Fucus-Zygoten. Planta 63, 356-365, 1964

BENTRUP, F.W.: Die Morphogenese pflanzlicher Zellen im elektrischen Feld. Z. Pflanzenphysiol. 59, 309-339, 1968

BENTRUP, F.W.: Elektrophysiologische Untersuchungen am Ei von Fucus serratus: das Membranpotential, Planta 94, 319-332, 1970

BENTRUP, F.W.: Einfluß von K^+-Ionen auf die Polaritätsinduktion bei Fucus serratus. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87, 215-221, 1974

BENTRUP, F.W.: Cell physiology. Cell electrophysiology and membrane transport. Progr. Bot. 37, 64-77, 1975

BLASIE, J.K.: The location of photopigment molecules in the cross-section of frog retinal receptor disk membranes. Biophys. J. 12, 191-204, 1972 a

BLASIE, J.K.: Net electric charge on photopigment molecules and frog retinal receptor disk membrane structure. Biophys. J. 12, 205-213, 1972 b

COSTER, H.G.L.: A quantitative analysis of the voltage-current-relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch through". Biophys. J. 5, 669-686, 1965

COSTER, H.G.L.: The role of pH in the punch-through effect in the electrical characteristics of Chara australis. Aust. J. Biol. Sci. 22, 365-374, 1969

COSTER, H.G.L.: The double fixed charge membrane: low frequency dielectric dispersion. Biophys. J. 13, 118-132, 1973 a

COSTER, H.G.L.: The double fixed charge membrane: solution-membrane ion partition effects and membrane potentials. Biophys. J. 13, 133-142, 1973b

COSTER, H.G.L. und ZIMMERMANN, U.: Direct demonstration of dielectric breakdown in the membranes of Valonia utricularis. Z. Naturforsch. 30C, 77-79, 1975b

COSTER, H.G.L. und ZIMMERMANN, U.: The mechanism of dielectric breakdown in the membranes of Valonia utricularis. J. Membr. Biol. 22, 73-90, 1975b

COSTER, H.G.L. und ZIMMERMANN, U.: Transduction of turgor pressure by cell membrane compression. Z. Naturforsch. 31C, 461-463, 1976

HAGER, A., MENZEL, H., KRAUSS, A.: Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. Planta 100, 47-75, 1971

HAUPT, W.: Die Induktion der Polarität bei der Spore von Equisetum. Planta 49, 61-90, 1957

HAUPT, W.: Die Entstehung der Polarität in pflanzlichen Keimzellen, insbesondere die Induktion durch Licht. Ergebn. Biol. 25, 1-32, 1962

JAFFE, L.F.: Tropistic responses of zygotes of the Fucaceae to polarized light. Exp. Cell. Res. 15, 282-299, 1958

JAFFE, L.F. und ETZOLD, H.: Orientation and locus of phototropic receptor molecules in spores of Botrytis and Osmunda. J. Cell. Biol. 13, 13-31, 1962

JAFFE, L.F.: Localization in the developing Fucus egg and the general role of localizing currents. Adv. in Morphogenesis 7, 295-327, 1968

JAFFE, L.F., ROBINSON, K.R. und NUCITELLI, R.: Local cation entry and self-electrophoresis as an intracellular localization mechanism. Annals N-Y. Acad. Sci. 238, 372-389, 1974

JAFFE, L.F., NUCITELLI, R.: Electrical controls of development. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6, 445-476, 1977

MARME, D.: Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28, 173-198, 1977

NOVAK, B.: An electrophysiological study on the spatial differentiation of plant cells. Diss. Universität Tübingen, 1972

NOVAK, B. und BENTRUP, F.W.: Orientation of Fucus egg polarity by electric a.c. and d.c. fields. Biophysik 9, 253-260, 1973

OESTERHELT, D. und STOECKENIUS, W.: Functions of a new Photoreceptor membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2853-2857, 1973

QUATRANO, R.S.: An ultrastructural study of the determined site of rhizoid formation in Fucus zygotes. Exp. Cell Res. 70, 1-12, 1972

RIEMANN, F., ZIMMERMANN, U. und PILWAT, G.: Release and uptake of hämoglobin and ions in red blood cells induced by dielectric breakdown. Biochim. Biophys. Acta 394, 449-462, 1975

ROBINSON, K.R. und JAFFE, L.F.: Ion movements in a developing Fucoid egg. Develop. Biol. 35, 349-361, 1973

WEISENSEEL, M.H. und JAFFE, L.F.: Membrane potential and impedance of developing Fucoid eggs. Develop. Biol. 27, 555-574, 1972

WEISENSEEL, M.H. und JAFFE, L.F.: Return to normal of Fucus egg membrane after microelectrode impalement. Exp. Cell Res. 89, 55-62, 1974

ZIMMERMANN, U., SCHULZ, J. und PILWAT, G.: Transcellular ion flow in Escherichia coli B and electrical sizing of bacterias. Biophys. J. 13, 1005-1013, 1973

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. und RIEMANN, F.: Dielectric breakdown of cell membranes. In "Membrane transport in plants" (Hrsg. ZIMMERMANN, U. und DAINTY, J.), Springer Verlag Heidelberg, 1974 a

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. und RIEMANN, F.: Dielectric breakdown of cell membranes. Biophys. J. 14, 881-889, 1974 b

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., BECKERS, F., RIEMANN, F.: Effects of external electrical fields on cell membranes. Bioelectrochem. Bioenerg. 3, 58-83, 1976

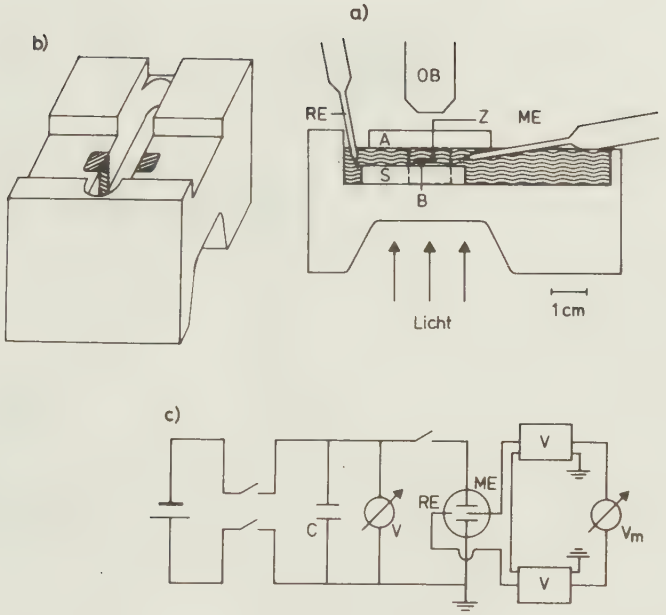

Abb. 1: a. (Plexiglas-)Kammer zur Pulsexposition und Membranpotential-Messung bei Fucus. Längsschnitt. Gestrichelt: Lage der Pulselektroden.

b. Schrägsicht auf Pulskammer (ohne Abdeckung (A), Schlitten (S), Barrikade (B)). Schraffiert: Pulselektroden (Pt-überzogenes Messing).

c. Meß- und Pulsschaltung. Erdfreie Messung des Membranpotentials V_m mit 2 Verstärkern (V).

Bezeichnungen:

A ... Abdeckung (Plexiglas)
B ... Barrikade (geradseitiges Deckglasstück auf Objektträger)
ME ... Meßelektrode
RE ... Referenzelektrode
OB ... Objektiv des Mikroskops
S ... Schlitten (Plexiglas)
Z ... Zelle

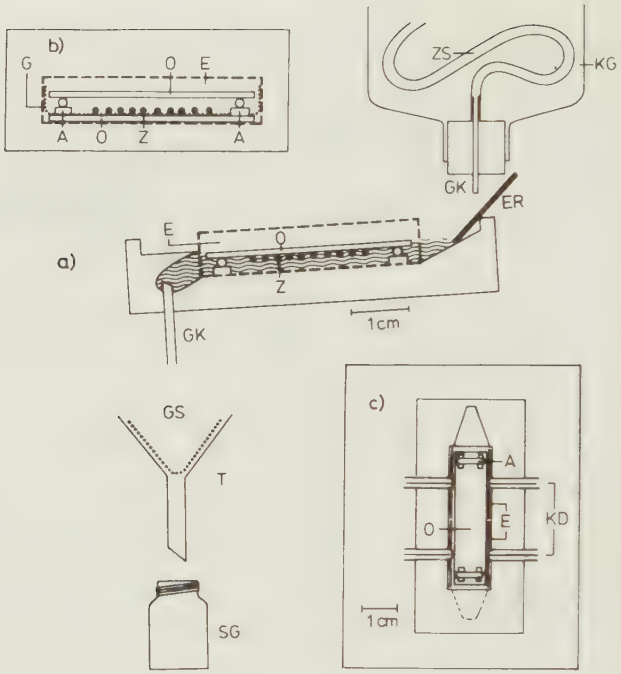

Abb. 2: a. Versuchsanordnung mit Durchlaufküvette (Längsschnitt) zur Pulsexposition und Eluierung älterer Fucus-Zygoten. Gestrichelt: Lage der Pulselektroden (E).

b. Abgewandelte Unterbringung der Zellen (Z) im Falle nicht festhaftungsfähiger unbefruchteter Fucus-Eier (oder junger Zygoten). Längsschnitt.

c. Aufsicht auf die Versuchsküvette

Bezeichnungen:

A ... Auflager für Objektträger
E ... Pulselektroden (je 2 Pt-Ir-Netze)
ER ... Einlaufrinne
G ... Gazewanne
GK ... Glaskapillare
GS ... Gazesieb
KD ... Abführender Kupferdraht (Lötstelle in Glasrohr eingeschmolzen)
O ... Objektträger
SG ... Szint.-Gläschen
T ... Trichter
Z ... Zellen
ZS ... Zuleitungsschlauch

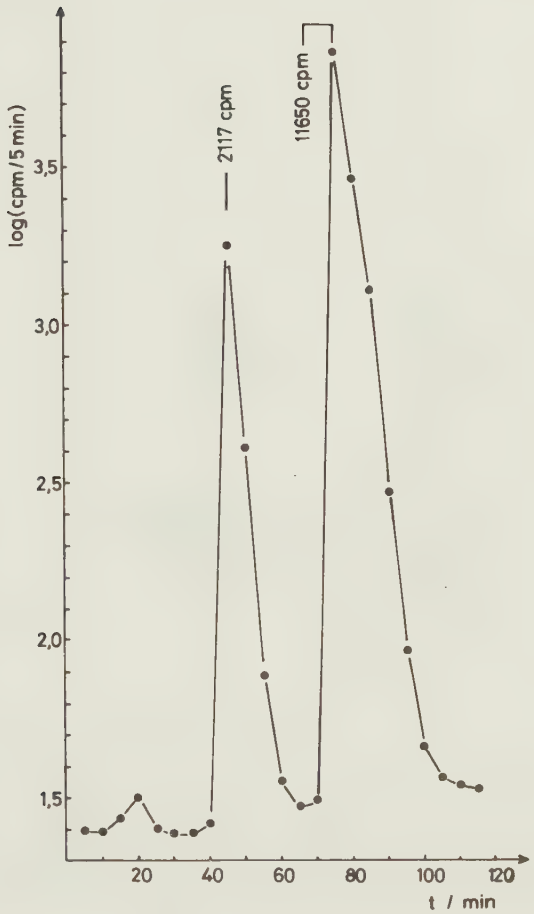

Abb. 3: $^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Küvette zur Zeit t des Durchlaufs (5 min-Fraktionen) bei Immission zweier Aktivitäts-"Pulse" der angegebenen Größe (cpm). Die Pfeile kennzeichnen jeweils das Ende einer Fraktion, in deren Mitte die Aktivität zugegeben wurde. Vor dem 1. "Puls" ist der "Background" (KSW ohne $^{86}Rb^{+}$) zu erkennen.

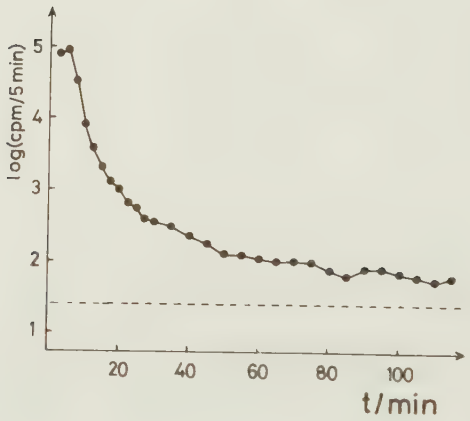

Abb. 4: $^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) eines vorher in KSW mit $^{86}Rb^{+}$ inkubierten Gazestücks ohne Zellen zur Zeit t des Auswaschens. Die Aufsummierung ergibt eine Anfangsaktivität von 120 000 cpm in der Küvette. Gestrichelt: KSW ohne $^{86}Rb^{+}$ ("Background").

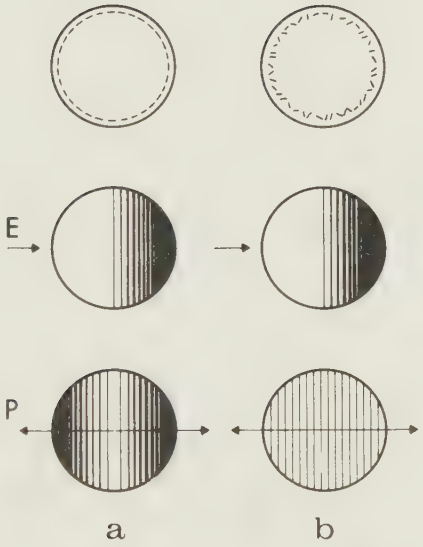

Abb. 5: Photoinduktion der Polarität bei der Fucus-Zygote.

a. Schema zur Entstehung des Absorptionsgradienten bei einseitigem unpolarisiertem Licht (E) und - aufgrund perikliner Anordnung der Photorezeptoren (Schwingungsebenen durch Striche angedeutet) - bei linear polarisiertem Licht (P)

b. Hypothese: Orientierungsverlust der Photorezeptoren infolge Depolarisation der Membran. Schwächung des Absorptionsgradienten bei linear polarisiertem Licht, nicht aber bei unpolarisiertem Licht.

- aus BENTRUP, 1974

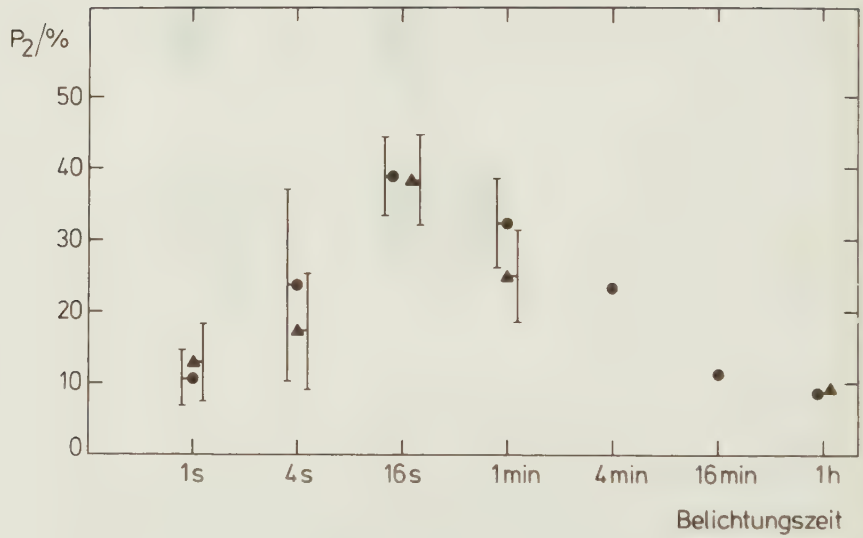

Abb. 6: Unter verschiedener K^+-Konzentration des Seewassers durch Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht der Intensität 1200 mW m^{-2} (λ_{max} = 459 nm) an der Fucus serratus-Zygote induzierte Polaritätsorientierung P_2. Abszisse: Belichtungszeit. ● : 10 mM K^+; ▲ : 30 mM K^+ (Exposition auf Belichtung beschränkt). 4 Versuche, insgesamt 5000 Zellen. Fehlerangabe: σ_M.

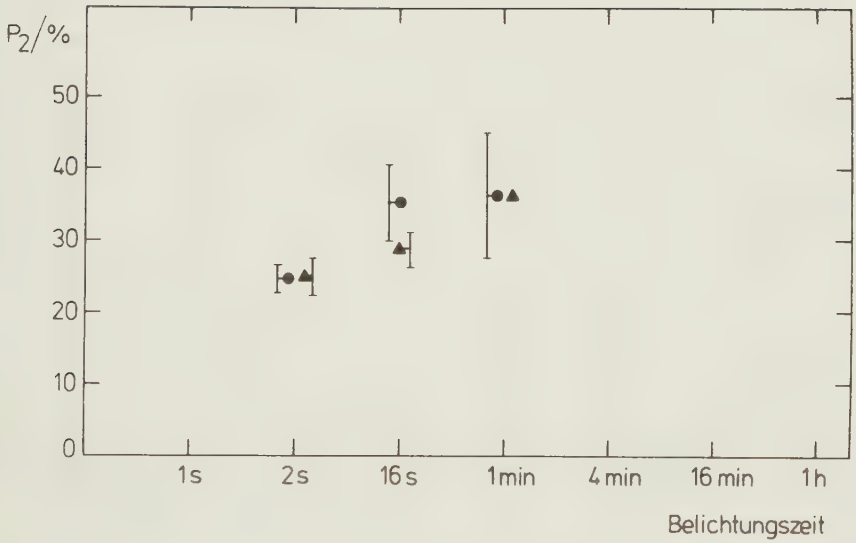

Abb. 7: Unter verschiedener K^+-Konzentration des Seewassers durch Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht der Intensität 1200 mW m^{-2} (λ_{max} = 459 nm) an der Fucus serratus-Zygote induzierte Polaritätsorientierung P_2. Abszisse: Belichtungszeit. ● : 10 mM K^+; ▲ : 100 mM K^+ (Exposition auf Belichtung beschränkt). 4 Versuche, 3200 Zellen. Fehlerangabe: σ_M.

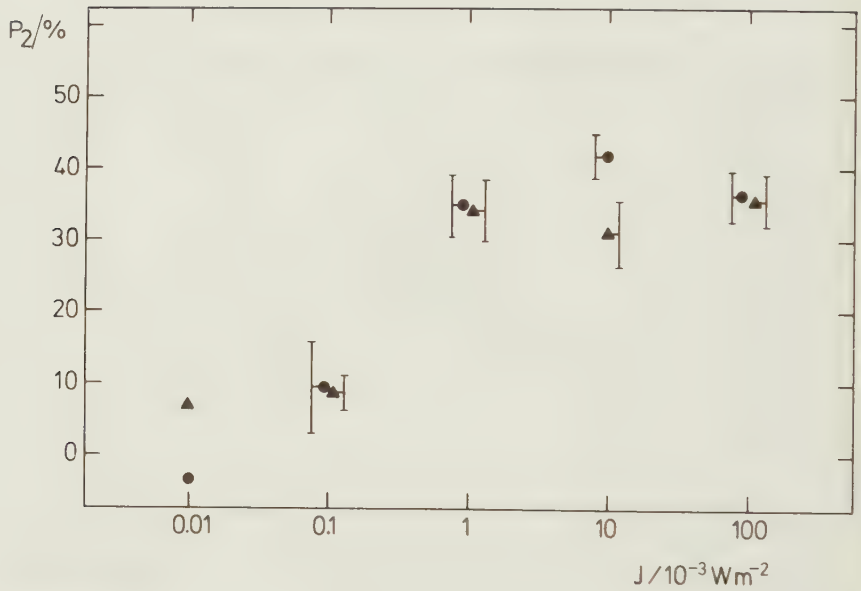

Abb. 8: Unter verschiedener K^+-Konzentration des Seewassers durch 6 h lange Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht (λ_{max} = 456 nm) an der Fucus serratus-Zygote induzierte Polaritätsorientierung P_2. Abszisse: Lichtintensität I. ●: 10 mM K^+; ▲: 30 mM K^+ (6 h lange Exposition während Belichtung). 3 Versuche, 9500 Zellen. Fehlerangabe: σ_M.

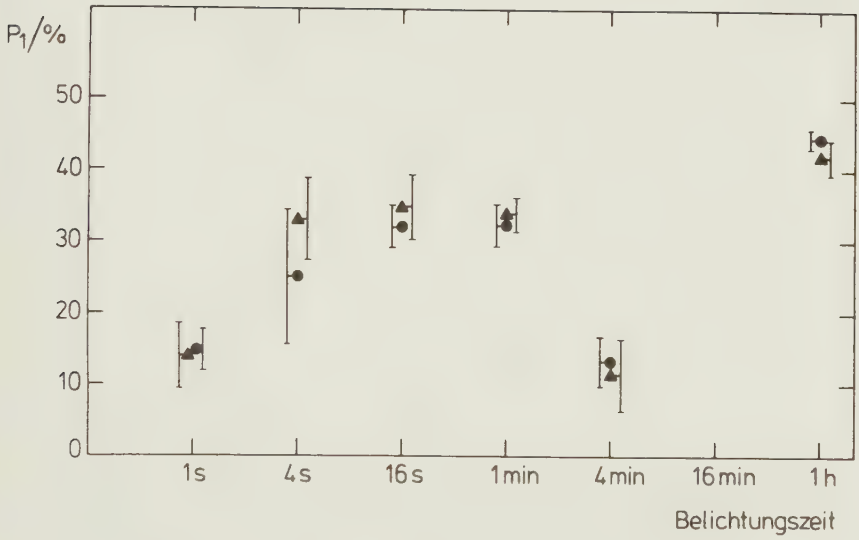

Abb. 9: Unter verschiedener K^+-Konzentration des Seewassers durch einseitige Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht (λ_{max} = 459 nm) der Intensität 1200 mW m^{-2} an der Fucus serratus-Zygote induzierte Polaritätsorientierung P_1. Abszisse: Belichtungszeit. ●: 10 mM K^+; ▲: 30 mM K^+ (Exposition während Belichtung). 4 Versuche mit 8200 Zellen für kurze Belichtung, 1 Versuch mit 3600 Zellen bei 1 h langer Belichtung. Fehlerangabe: σ_M.

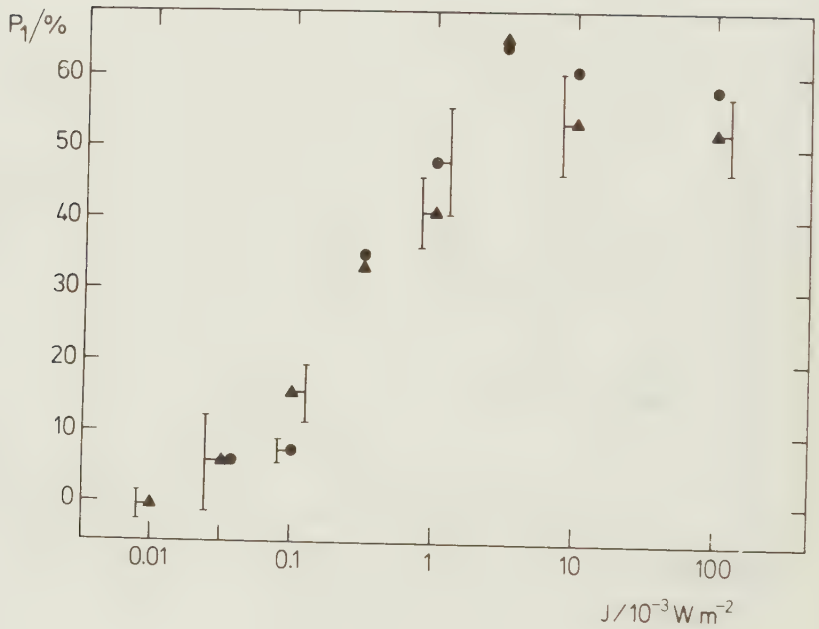

Abb. 10: Unter verschiedener K^+-Konzentration des Seewassers durch 6 h lange einseitige Bestrahlung mit unpolarisiertem Licht (λ_{max} = 456 nm) an der Fucus serratus-Zygote induzierte Polaritätsorientierung P_1. Abszisse: Lichtintensität I. ●: 10 mM K^+; ▲: 30 mM K^+ (6 h lange Exposition während Belichtung). 5 Versuche, 10500 Zellen. Fehlerangabe: σ_M.

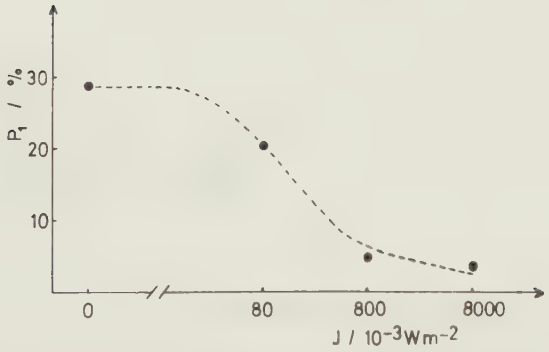

Abb. 11: Equisetum variegatum-Spore. Dosiseffektkurve der "Störinduktion".

Schwächung der von einseitigem, unpolarisiertem Licht (Dauer 1 min, Intensität 800 mW m^{-2}, λ_{max} = 456 nm) induzierten Polaritätsorientierung P_1 durch gleichzeitige ungerichtete Bestrahlung (λ_{max} = 456 nm) mit der Intensität I. 1 Versuch, 1400 Zellen.

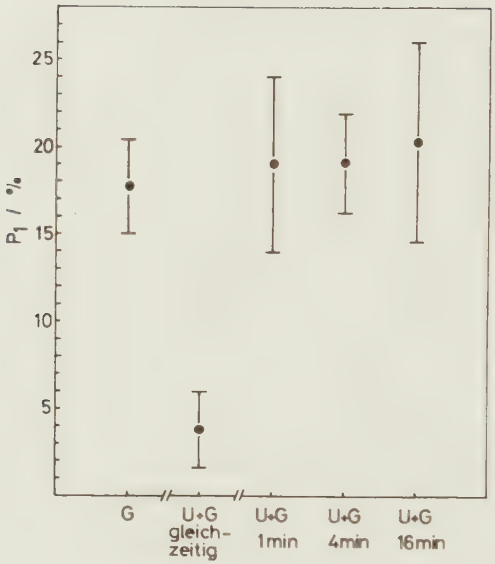

Abb. 12: Equisetum variegatum-Spore. "Zeitfunktion" der Störinduktion.

Schwächung der von einseitigem, unpolarisiertem Licht (Dauer 1 min, Intensität 800 mW m^{-2}, λ_{max} = 456 nm) induzierten Polaritätsorientierung P_1 durch gleichzeitige und vorhergehende ungerichtete Bestrahlung (Dauer 1 min, Intensität 800 mW m^{-2}, λ_{max} = 456 nm). Abszisse: alleinige Gabe des gerichteten Reizes (G); gleichzeitige Gabe beider Reize (U+G), zeitversetzte Gabe des gerichteten nach dem ungerichteten Reiz (U+G, mit Angabe des Zeitintervalls vom Ende des 1. zum Beginn des 2. Reizes). 7 Versuche, 17 900 Zellen. Fehlerangabe: σ_M.

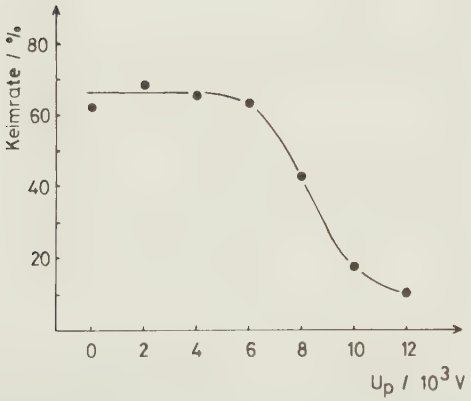

Abb. 13: Keimrate (Prozentzahl gekeimter Zellen) von Fucus serratus-Eiern bei Anwendung eines Entladungspulses (τ_p = 36 µs) < 3 h nach Befruchtung als Funktion der Pulsspannung U_p. 1 Versuch, 3100 Zellen.

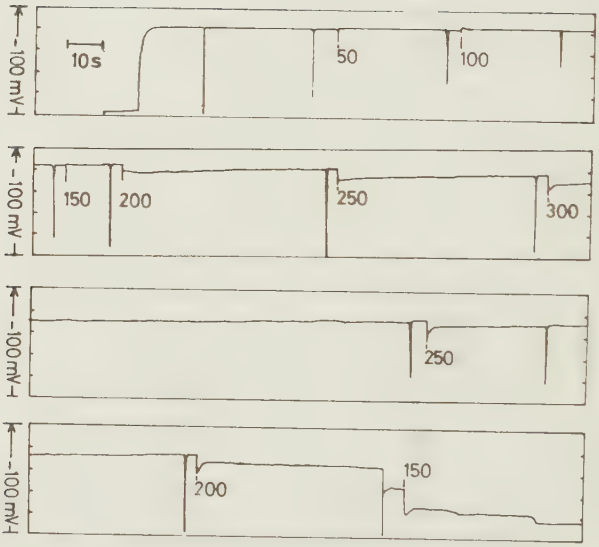

Abb. 14: Schreiberaufzeichnung des Membranpotentials einer älteren (> 4 h) Zygote von Fucus serratus unter Anwendung von 2 µF (τ_p = 70 µs)-Pulsen (siehe Markierungen, die Zahlen geben die Pulsspannung U_p in Volt). (Die Ausschläge außerhalb von Pulsen entstanden beim Laden des Kondensators. Das ohne Anstechen der Zelle angezeigte Potential ist am Beginn der Aufzeichnung zu erkennen.)

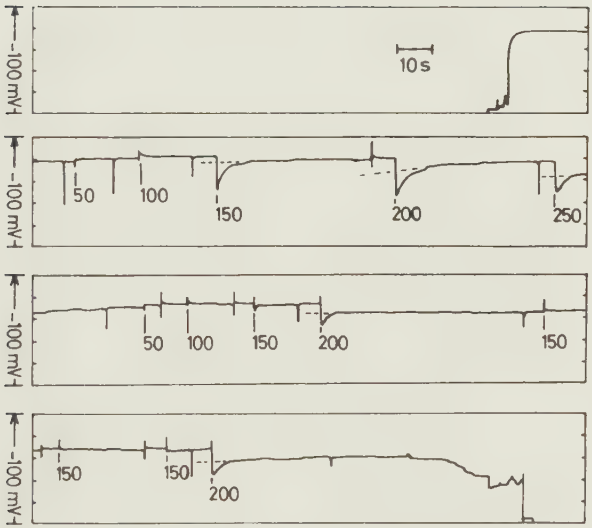

Abb. 15: Schreiberaufzeichnung des Membranpotentials V_m einer älteren (> 4 h) Zygote von Fucus serratus unter Anwendung von 2 µF (τ_p = 70 µs)-Pulsen (siehe Markierungen, die Zahlen geben die Pulsspannung U_p in Volt). Gestrichelt: Extrapolation der vom Puls bewirkten Potentialänderung ΔV_m (s. Text). (Die Ausschläge außerhalb von Pulsen entstanden beim Laden des Kondensators. Das ohne Anstechen der Zelle angezeigte Potential ist am Beginn der Aufzeichnung zu erkennen.)

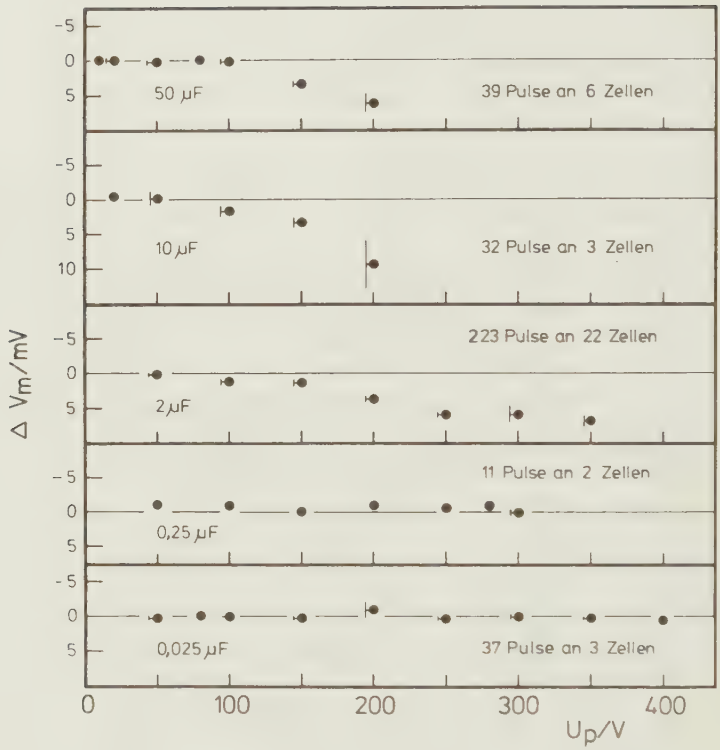

Abb. 16: Änderung ΔV_m des Membranpotentials älterer (> 4 h) Zygoten von Fucus serratus nach einem Entladungspuls der Kapazität 2 µF (τ_p = 70 µs) und - in geringerem Versuchsumfang (siehe angegebene Puls- und Zellzahlen) - mit den Kapazitäten 50 µF (1759 µs), 10 µF (352 µs), 0,25 µF (8,8 µs) und 0,025 µF (0,9 µs) in Abhängigkeit von der Pulsspannung U_p. Mittelwerte sind mit der Standardabweichung σ_M des Mittelwertes versehen.

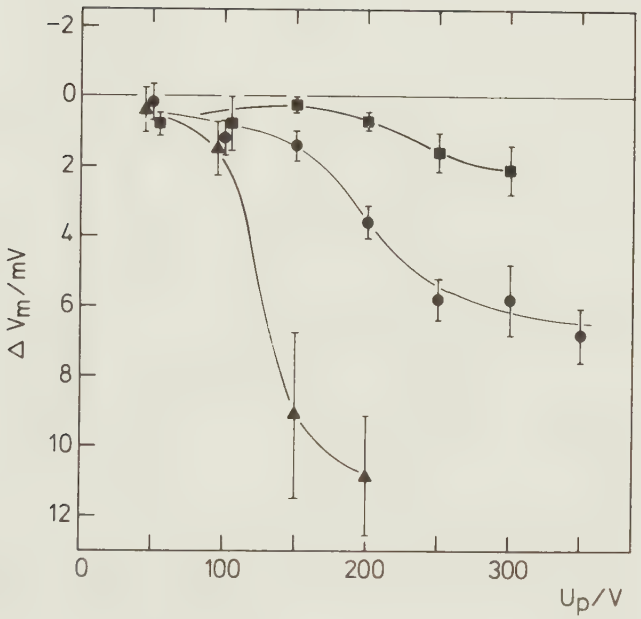

Abb. 17: Änderung ΔV_m des Membranpotentials älterer (> 4 h) Zygoten von Fucus serratus nach einem 2 µF (70 µs)-Puls unter künstl. Seewasser (KSW) von 10 mM K^+ (●, Werte aus Abb. 16), 1 mM K^+ (▲) und 100 mM K^+ (■). Abszisse: Pulsspannung U_p. Puls- und Zellzahlen: bei 10 mM K^+ 223 P. an 22 Z., bei 100 mM K^+ 40 P. an 5 Z., bei 100 mM 60 P. an 4 Z. Fehlerangabe: σ_M.

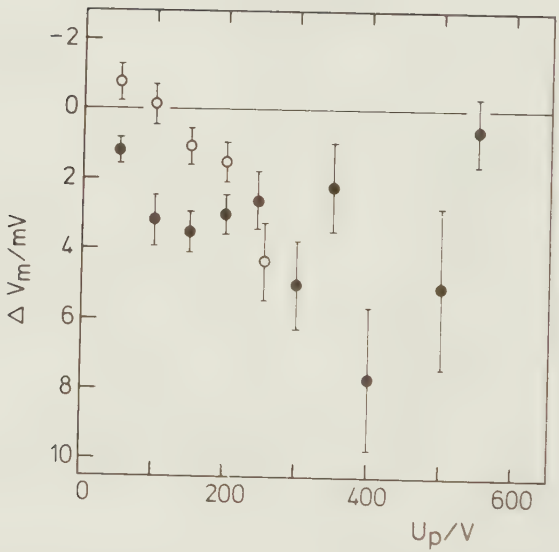

Abb. 18: Änderung ΔV_m des Membranpotentials unbefruchteter Eier (○) und junger (< 3 h) Zygoten (●) von Fucus serratus nach einem 2 µF (70 µs)-Puls. Abszisse: Pulsspannung U_p. Puls- und Zellzahlen: unbefr. Eier: 45 P. an 3 Z.; junge Zygoten: 224 P. an 19 Z. Fehlerangabe: σ_M.

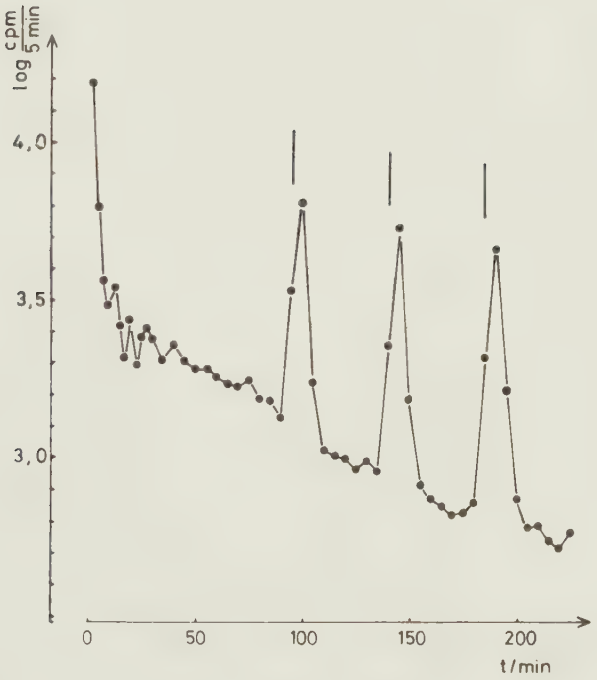

Abb. 19: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Effluxkinetik Abb. 20, Pulsabgaben Abb. 21).
$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (anfangs 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)-Pulsen der Spannung U_p = 350 V (Pfeil: Pulsfraktion). (600 Zellen auf Objektträger, Inkubation im Alter 1 - 6 h, T beim Auswaschen: 15°C.)

Abb. 20: $^{86}Rb^{+}$-Effluxkinetik zum Versuch Abb. 19 an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens unter Anwendung von 2 µF (42 µs)-Pulsen der Spannung U_p = 350 V (Pfeil: Ende einer Pulsfraktion).

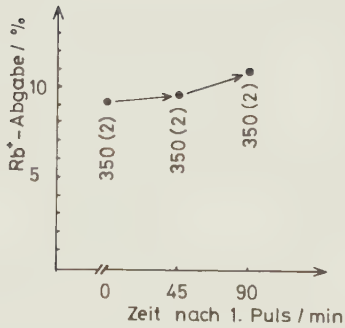

Abb. 21: Pulsabgabe-Diagramm zum $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 19 an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Abgaben der Zellen (ältere Zygoten), erzielt durch 2 µF (42 µs)-Pulse der Spannung U_p = 350 V. Abszisse: Zeit nach dem 1. Puls.

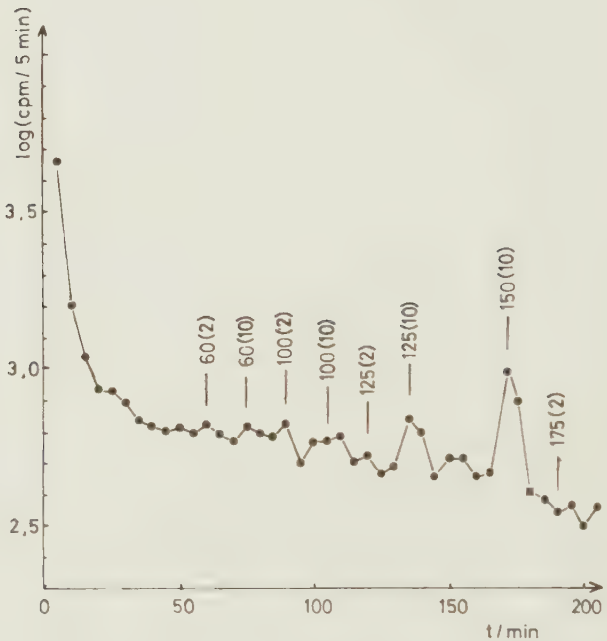

Abb. 22: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsen (Pfeil: Pulsfraktion) schrittweise erhöhter Spannung U_p. Zahlenangaben: U_p in V, Pulskapazität C_p in µF (in Klammern). (360 Zellen auf Objektträger; Inkubation im Alter 1 - 7 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

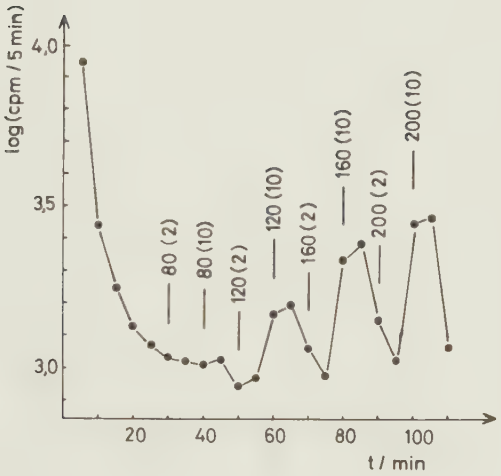

Abb. 23: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsen (Pfeil: Pulsfraktion) schrittweise erhöhter Spannung U_p. Zahlenangaben: U_p in V, Pulskapazität C_p in µF (in Klammern). (102 Zellen auf Gaze; Inkubation im Alter 2 - 10 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

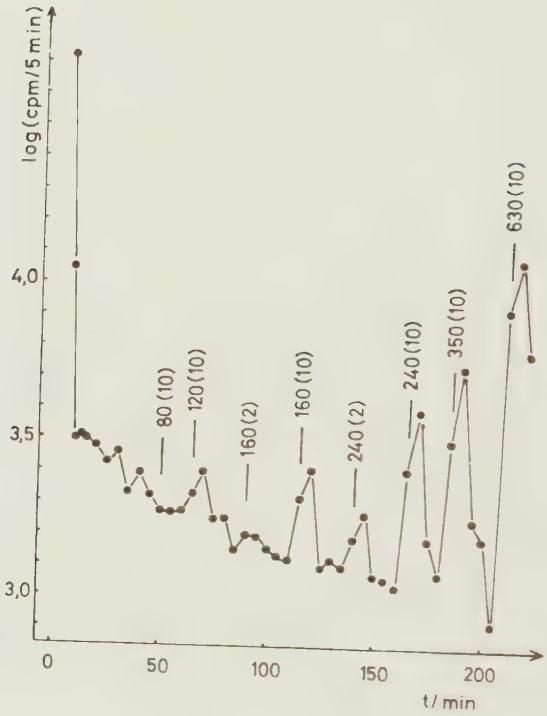

Abb. 24: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 29).

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (unbefr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsen (Pfeil: Pulsfraktion) schrittweise erhöhter Spannung U_p. Zahlenangaben: U_p in V, Pulskapazität C_p in µF (in Klammern). (105 Zellen auf Gaze; Inkubationsdauer 3,5 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

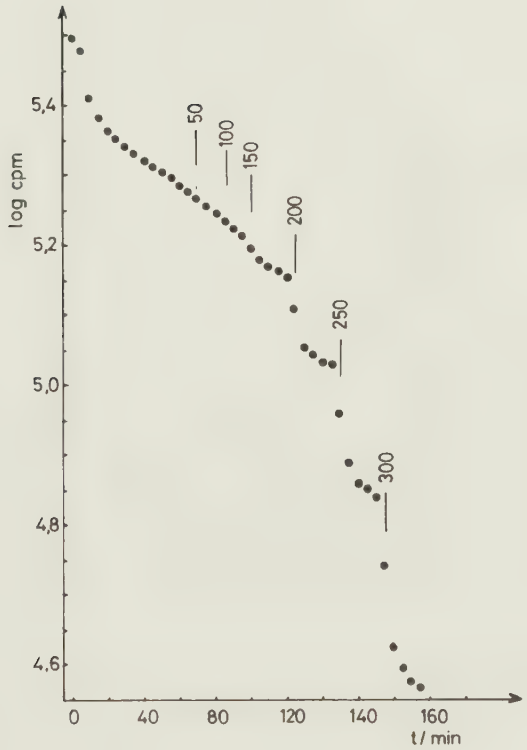

Abb. 25: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 28).

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 10-fachen (Pulsabstand 30 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Ende einer Pulsfraktion) schrittweise erhöhter Spannung U_p. Zahlenangaben: U_p in V. (700 Zellen auf Objektträger; Inkubation im Alter 2 - 6 h; T beim Auswaschen: 22°C.

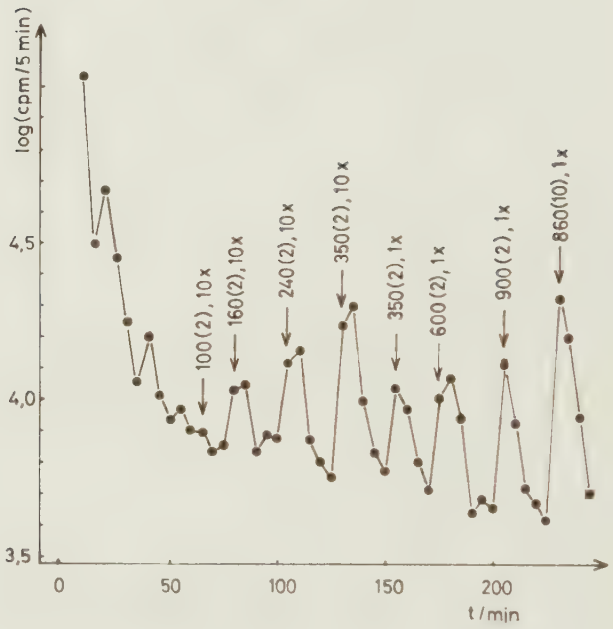

Abb. 26: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 30).

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (unbefr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsungen (Pfeil: Pulsfraktion) verschiedener Spannung U_p und Pulszahl (Pulsabstand 30 s). Zahlenangaben: U_p in V; Pulskapazität C_p in µF (in Klammern), Pulszahl. (Unbestimmte Zellzahl - aber nicht über einigen tausend - auf Gaze; Inkubationsdauer 4 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

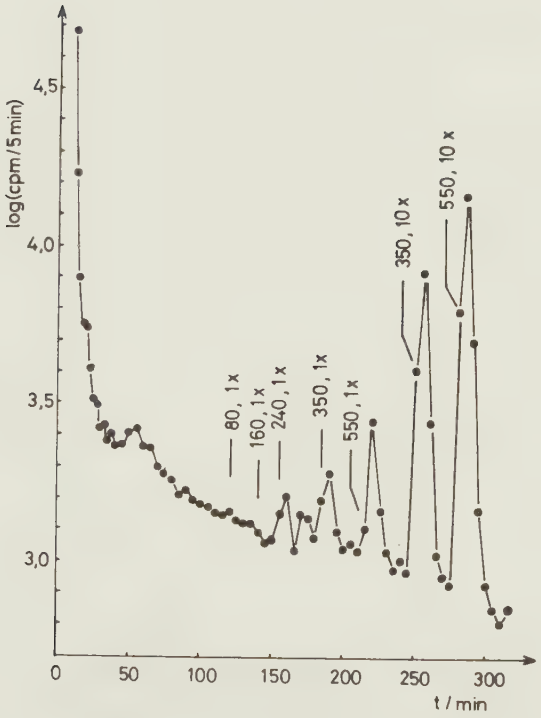

Abb. 27: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 31).

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (unbefr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (erst 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 1-fachen und 10-fachen (Abstand 30 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Pulsfraktion) verschiedener Spannung U_p. Zahlenangaben: U_p in V, Pulszahl. (2600 Zellen auf Gaze; Inkubationsdauer 18 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

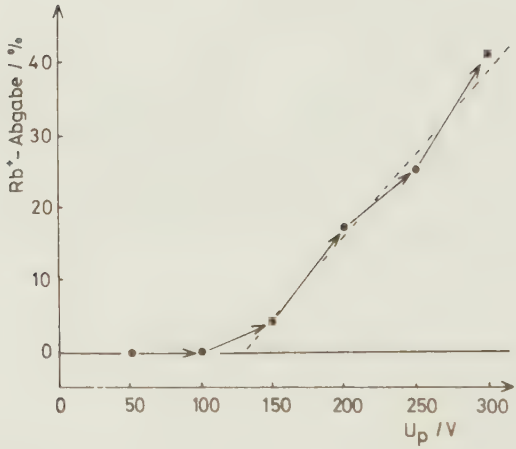

Abb. 28: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 25 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (ältere Zygoten), erzielt durch 10-fache 2 µF (42 µs)-Pulsungen schrittweise erhöhter Spannung U_p. Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen. Gestrichelt: Extrapolation der kritischen Pulsspannung U_{krit}.

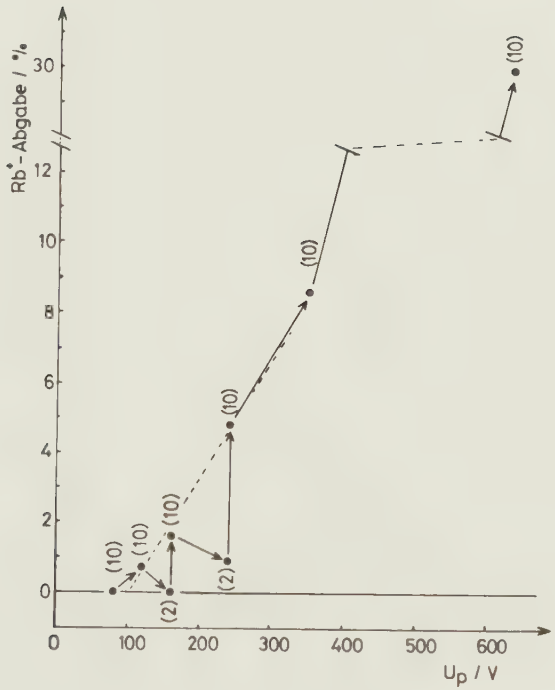

Abb. 29: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 24 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (unbefr. Eier), erzielt durch 10-fache 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsungen schrittweise erhöhter Pulsspannung U_p. Zahlenangabe: Pulskapazität C_p. Gestrichelt: Extrapolation der kritischen Pulsspannung U_{krit}.

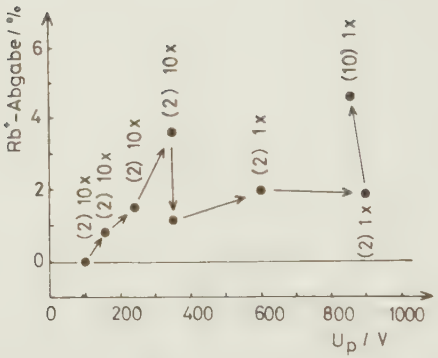

Abb. 30: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 26 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (unbefr. Eier), erzielt durch 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsungen verschiedener Spannung U_p und Pulszahl. Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen. Zahlenangaben: Pulskapazität C_p in µF (in Klammern), Pulszahl.

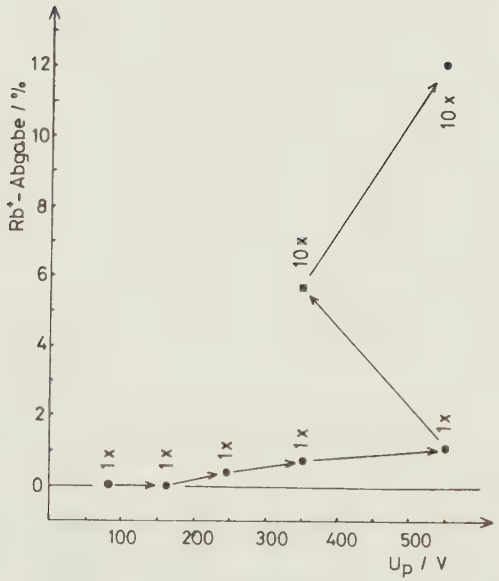

Abb. 31: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 27 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (unbefr. Eier), erzielt durch 1-fache und 10-fache 2 µF (42 µs)-Pulsungen verschiedener Spannung U_p. Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen. Zahlenangaben: Pulszahl.

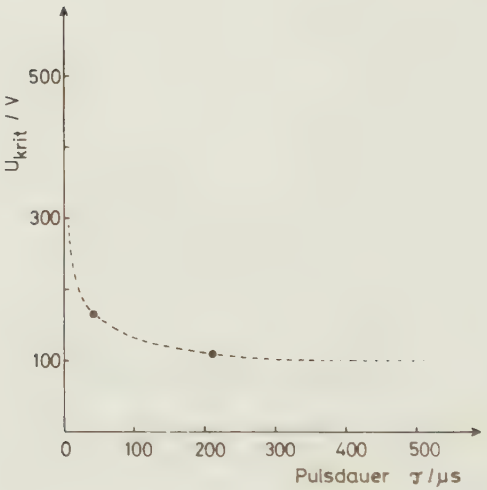

Abb. 32: Resümee zur Pulsdauerfunktion U_{krit} (τ_p) der krit. Pulsspannung aus den $^{86}Rb^+$-Effluxversuchen Abb. 22 - 27.

Gemeinsame Werte für ältere (> 5 h) Zygoten und unbefr. Eier von Fucus für die Pulsdauern 42 und 211 µs. Gestrichelt: Funktionsverlauf.

Abb. 33: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 10-fachen (Pulsabstand 30 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Pulsfraktion). Beim Auswaschen und Pulsen wurde Seewasser (KSW) mit 100 mM K^{+} (statt wie sonst 10 mM) verwendet. Zahlenangaben: Pulsspannung U_p in V. (30 Zellen auf Objektträger; Zellen nach dem Versuch inhomogen aussehend; Inkubation im Alter 2 - 7 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

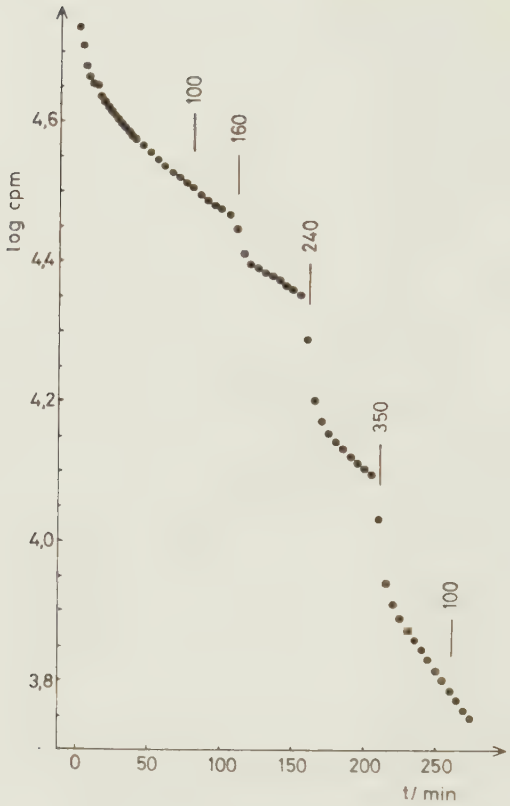

Abb. 34: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 35).

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (erst 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 10-fachen (Pulsabstand 30 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Ende einer Pulsfraktion). Als Medium während des Auswaschens wurde Seewasser (KSW) mit 100 mM statt wie sonst 10 mM K^{+} verwendet. Zahlenangaben: Pulsspannung U_p in V. (600 Zellen auf Objektträger; Zellen nach Versuch z.T. inhomogen aussehend; Inkubation im Alter 2 - 7 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

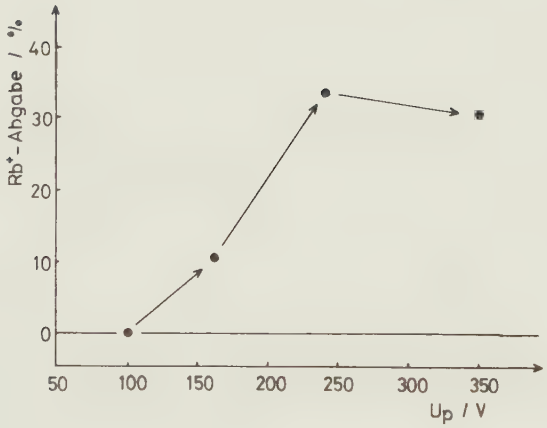

Abb. 35: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 34 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (ältere Zygoten), erzielt durch 10-fache 2 µF (42 µs)-Pulsungen schrittweise erhöhter Spannung U_p. Die Pulsexposition fand unter Seewasser (KSW) mit 100 mM K^{+} (sonst 10 mM) statt. Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen.

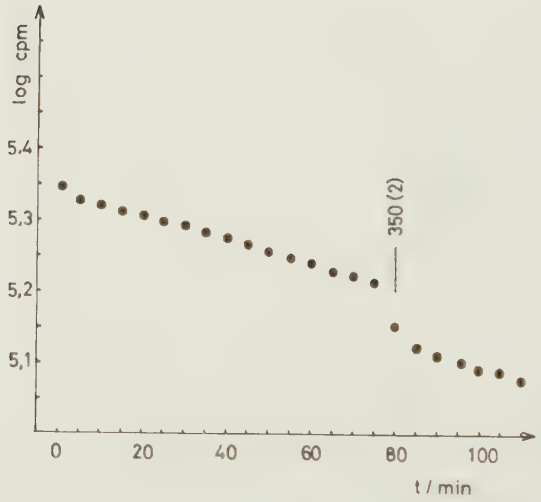

Abb. 36: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung eines 2 µF (42 µs)-Pulses (Pfeil: Ende der Pulsfraktion) der Spannung U_p = 350 V. (ca. 500 Zellen auf Objektträger; Inkubation im Alter 2 - 10 h; intensives Vorwaschen, daher kurze Phase des Auswaschens von Badresten; T beim Auswaschen: 22°C.)

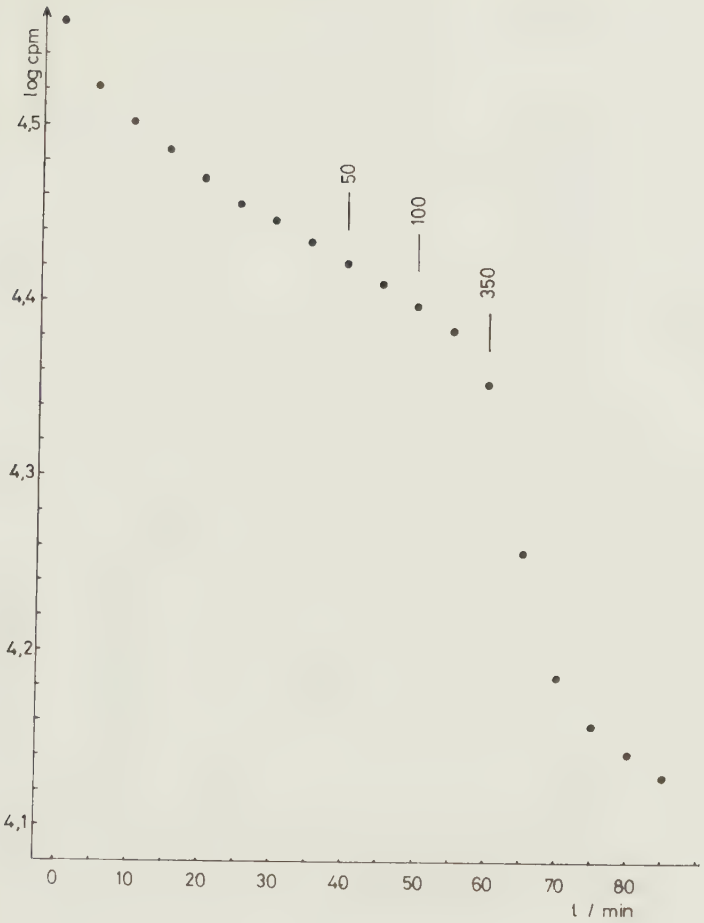

Abb. 37: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 10-fachen (Pulsabstand 10 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Ende einer Pulsfraktion). Zahlenangaben: Pulsspannung U_p in V. (120 Zellen auf Objektträger; Inkubation im Alter 2 - 5 h; T beim Auswaschen: 22°C.)

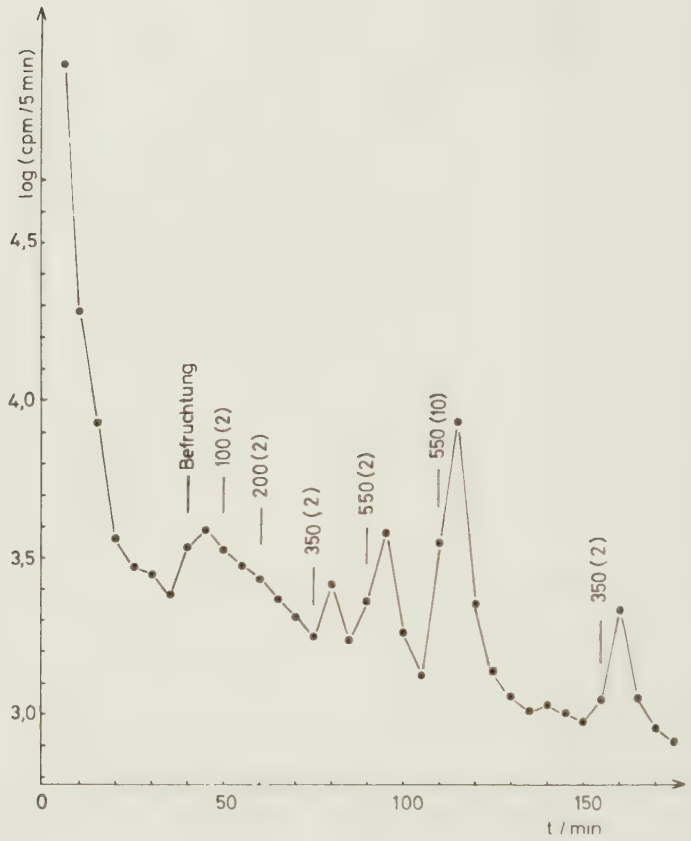

Abb. 38: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 39).

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (frisch befr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung 10-facher (Pulsabstand 20 s) 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsungen. (Pfeil: Pulsfraktion). Die Befruchtung (Zugabe der Spermatozoiden) geschah nach Beginn des Auswaschens (Pfeil). Zahlenangaben: Pulsspannung U_p, Pulskapazität C_p (in Klammern). (160 Zellen auf Gaze; Inkubationsdauer 6 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

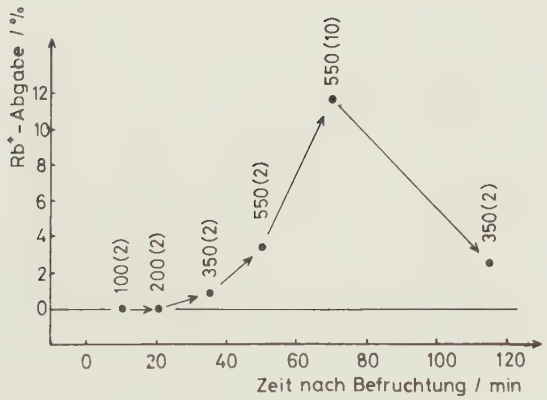

Abb. 39: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 38 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (frisch befr. Eier), erzielt durch 10-fache 2 µF (42 µs)- und 10 µF (211 µs)-Pulsungen. Abszisse: Zeit nach Befruchtung. Zahlenangaben: Pulsspannung U_p, Pulskapazität C_p (in Klammern).

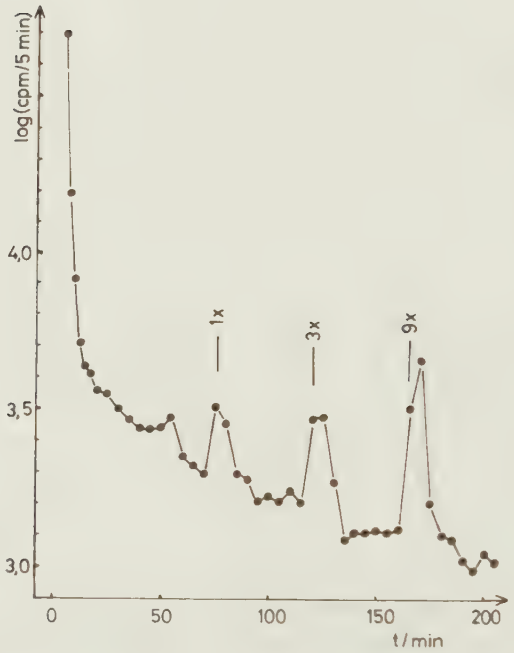

Abb. 40: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben in Abb. 41)

$^{86}Rb^{+}$-Abgaberate (cpm/5 min) der Zellen (unbefr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (erst 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeile: Pulsfraktion) der Spannung U_p = 550 V und verschiedener Pulszahl (Angabe in Diagramm, Pulsabstand 30 s). (220 Zellen auf Gaze; Inkubationsdauer 4 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

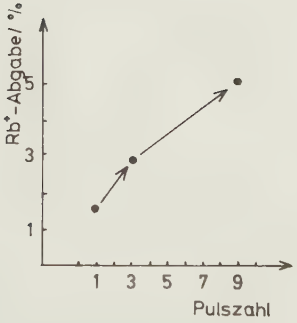

Abb. 41: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 40 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) der Zellen (unbefr. Eier), erzielt durch 2 µF (42 µs)-Pulsungen der Spannung U_p = 550 V und verschiedener Pulszahl (Abszisse). Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen.

Abb. 42: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus (Pulsabgaben Abb. 43).

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (unbefr. Eier) zur Zeit t des Auswaschens (erst 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeile: Ende einer Pulsfraktion) der Spannung U_p = 350 V (letzte Pulsung: 80 V). Pulszahl und Pulsabstand wurden variiert (s. Angaben in der Abbildung). (2100 Zellen auf Gaze; Inkubationsdauer 18 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

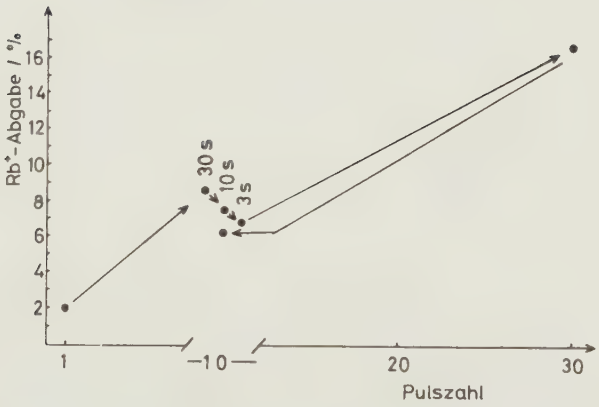

Abb. 43: Pulsabgaben aus $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch Abb. 42 an Fucus serratus.

Rb^{+}-Abgaben (%) aus den Zellen (unbefr. Eier), erzielt durch 2 µF (42 µs)-Pulsungen der Spannung U_D = 350 V und verschiedener Pulszahl (Abszisse). Bei der Pulszahl 10 wurde der Abstand der Pulse variiert (s. Angaben), die 30-fache Pulsung geschah in Abständen von 10 s. Verbindungspfeile: Reihenfolge der Pulsungen.

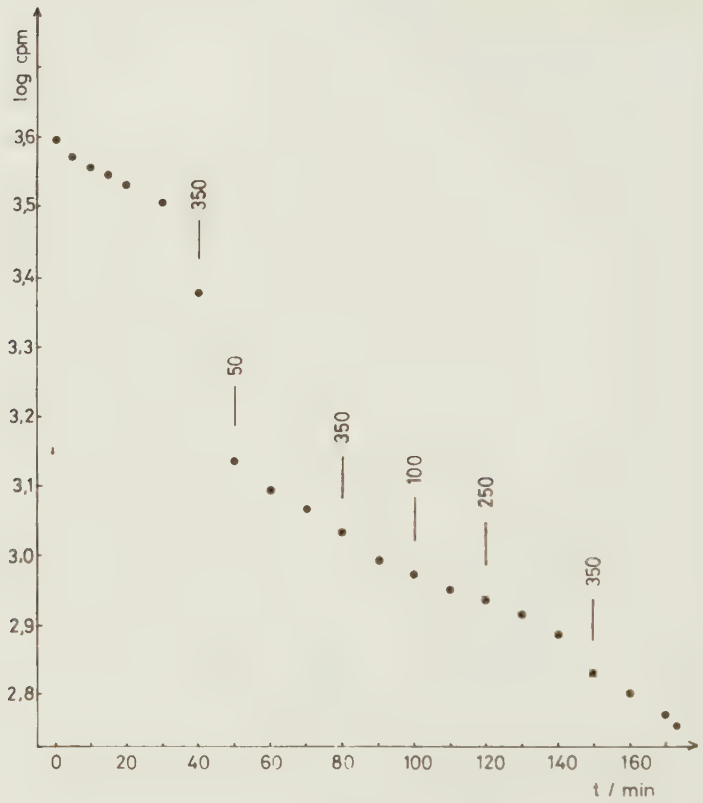

Abb. 44: $^{86}Rb^{+}$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{86}Rb^{+}$-Gehalt (cpm) der Zellen (ältere Zygoten) zur Zeit t des Auswaschens (5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 60-fachen (Pulsabstand 1 s) 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeil: Ende einer Pulsfraktion). Zahlenangabe: Pulsspannung U_p. Die Aktivitäten der Fraktionen lagen z.T. unter 100 cpm, können also durch die Beiträge von Background (26 cpm) und Resten des Inkubationsbads einen höheren $^{86}Rb^{+}$-Gehalt liefern, als in den Zellen vorliegt und daher auch eine zu niedrige prozentuale Pulsabgabe. Für die 1. Pulsung mit 350 V geben wir deshalb nur einen Mindestwert der Rb^{+}-Abgabe von 51 % an. (110 Zellen auf Objektträger; die Zellen sahen nach dem Versuch sämtlich inhomogen aus; Inkubation im Alter 2 - 6 h; T beim Auswaschen: 22°C.)

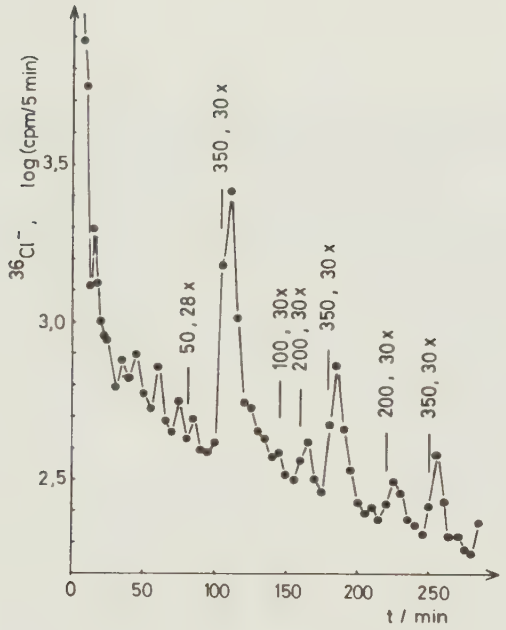

Abb. 45: $^{36}Cl^-$-Effluxversuch an Fucus serratus.

$^{36}Cl^-$-Abgaberaten (cpm/5 min) der Zellen zur Zeit t des Auswaschens (erst 2,5 min-, dann 5 min-Fraktionen) unter Anwendung von 2 µF (42 µs)-Pulsungen (Pfeile: Pulsfraktionen). Zahlenangaben: Pulsspannung U_p, Pulszahl (Pulsabstand 10 s). Die niederen Aktivitätsmengen der Fraktionen enthalten möglicherweise wieder einen beträchtlichen nicht aus den Zellen stammenden Anteil (vgl. Legende zu Abb. 44). Für die 1. Pulsung mit 350 V läßt sich daher wieder nur ein Mindestwert der Cl^--Abgabe von 16 % angeben. Der Versuch wurde mit am Tag vorher befruchteten Individuen (samt einem ungewissen Anteil ev. unbefruchtet gebliebener Zellen) ausgeführt. (10 000 (!) Individuen oder Eier auf Gaze; die Zellen sahen nach dem Versuch inhomogen aus; Inkubation im Alter 1 - 18 h; T beim Auswaschen: 15°C.)

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. F.W. Bentrup für seine vielseitig anleitende und anregende Betreuung dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. U. Zimmermann für Anregungen und freundliches Entgegenkommen bei meinen Untersuchungen. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Biophysik, des Instituts für Biologie I, des Isotopenlabors der Universität Tübingen und des Instituts für biophysikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich, besonders auch Herrn Dr. E. Steudle und Herrn Dr. C. Holzapfel,danke ich vielmals für wertvolle Hilfe.

Lebenslauf

Gauger, Rolf Bruno.
Geboren am 25. 1. 195o in Saulgau.
Eltern: Dr. Rudolf Gauger und Dr. Ilse Gauger geb. Israel.
1953 Umzug nach Balingen, 1956 nach Tuttlingen.
1956 - 196o Volksschule in Balingen und Tuttlingen.
Seit 196o Gymnasium Tuttlingen, Juni 1968 Reifeprüfung.
Seit WS 1968/69 Universität Tübingen (Biologie, Physik).
Oktober 197o Zwischenprüfung in Biologie und Physik.
11. 9. 1974 Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Biologie und Physik. Zulassungsarbeit am Institut für Biologie I, Abteilung Biophysik der Pflanzen.
Von September 1974 bis März 1978 fertigte ich ebenfalls unter Anleitung von Prof. Dr. F.W. Bentrup an der Abteilung Biophysik der Pflanzen die vorliegende Dissertation an.

Akademische Lehrer

M. Baumann, F.W. Bentrup, W. Braunbek, E. Bünning, K. Drumm, F. Gönnenwein, K.G. Grell, D.H. Höhn, F. Jüttner, H. Krüger, E. Kulzer, K. Mägdefrau, F.P. Möhres, R. Mühleisen, E. Müller, H. Raaf, A. Rieker, W. Rüdorff, V. Schwartz, W. Schweizer, B. Schwemmle, F. Wahl, E. Zetsche.